

UTICAJ PUTRESCINA NA INTENZITET LIPIDNE PEROKSIDACIJE U MOŽDANOM TKIVU PACOVA SA HOLESTAZOM

Dušan Sokolović¹, Gordana Bjelaković¹, Jelenka Nikolić¹, Gordana Kocić¹, Boris Đinđić², Dušica Pavlović¹, Stojan Radić², Jelena Bašić¹, Marko Jović i Dimitros Koutsonanos³

Encefalopatija u holestazi rezultat je akumulacije nekonjugovanog bilirubina (UCB) i hidrofobnih žučnih kiselina (BA) u mozgu. Toksične BA i UCB izazivaju neurotoksičnost (apoptozu neurona). Putrescin, spermidin i spermin su endogeni poliamini neophodni za rast, regeneraciju i diferencijaciju ćelija. Putrescin ispoljava protektivan efekat na oštećen CNS, svojim antiapoptotičkim i antioksidativnim delovanjem.

Cilj ovog istraživanja bio je analiziranje efekata putrescina na stepen lipidne peroksidacije u mozgu u uslovima holestaze.

Wistar pacovi su bili podeljeni u 5 grupa: I-kontrolna, II-lažno operisani pacovi, III-davanje samo putrescina eksperimentalnim životinjama, IV-životinje sa podvezanim ductus choledochusom, V-pacovi sa holestazom, tretirani putrescinom (150 mg/kg TM ip.). Životinje su žrtvovane nakon 9 dana eksperimenta.

Administracija putrescina pacovima sa holestazom, smanjuje koncentraciju UCB i BA u krvnoj plazmi, u odnosu na holestazne životinje (29.2±3.3 vs. 43.6±5.9 μmol/l i 11.4±0.8 vs. 22.8±2.6 μmol/l; p < 0.001). Intenzitet lipidne peroksidacije (procenjen na osnovu sadržaja malondialdehida-MDA) bio je povećan u mozgu pacova sa holestazom (4.98±0.54 vs. lažno operisani 3.99±0.32 nmol/mg prot; p < 0.001). Putrescin smanjuje nivo MDA u mozgu V grupe u odnosu na IV grupu pacova (2.25±0.42 vs. 4.98±0.54 nmol/mg proteina; p<0.001). Povećanje aktivnosti cerebralne poliamin oksidaze (PAO) kod životinja sa holestazom (1.25±0.09 vs. lažno operisani 0.81±0.09 U/mg proteina; p < 0.001), dovodi do povećanja nivoa 3-Acetamidopropanola i H₂O₂, koji dovode do oksidativnog stresa i ćelijske smrti. Davanje putrescina holestaznim životinjama, smanjuje aktivnost cerebralne PAO u odnosu na pacove sa holestazom (1.02±0.07 vs. 1.25±0.09 U/mg proteina; p < 0.001).

Aplikacija putrescina pacovima sa holestazom normalizuje oksidativni stres u mozgu i ispoljava neuroprotektivni efekat. *Acta Medica Mediana* 2006;45(2):45-51.

Ključne reči: putrescin, lipidna peroksidacija, holestaza, mozak

Katedra za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu¹
Katedra za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu²
Hospital of Thessaloniki³

Kontakt: Dušan Sokolović
Institut za biohemiju
Medicinski fakultet
Bulevar Dr Zorana Đinđića 81
18000 Niš, Srbija i Crna Gora
E-mail: soko@medfak.ni.ac.yu

Uvod

Holestaza je poremećaj funkcije jetre nastao zbog nemogućnosti oticanja žuči žučnim putevima u tanko crevo, koji za posledicu ima retenciju žučnih konstituenasa u jetri i regurgitaciju u krvi. Dolazi do oštećenja ćelija jetre i mozga delovanjem toksičnih žučnih kiselina i nekonjugovanog bilirubina (1). Ranije su brojni istraživači citotoksičnost žučnih kiselina pripisivali njihovim deterdženskim svojstvima (2). Novije studije pokazuju da mikromolarne koncentracije žučnih kiselina u ćeliji izazivaju oksidativni stres i povećanje intenziteta lipidne peroksidacije, kao i ošteće-

nje mitohondrija i programiranu ćelijsku smrt (3). Vert i sar. (4) su dokazali da su hiperbilirubinemija i hipoksija najčešći uzroci oštećenja CNS-a u holestaznom sindromu.

Lipidna peroksidacija je proces oštećenja tkiva, delovanjem slobodnih radikala. Nervni sistem je izuzetno osetljiv na delovanje slobodnih radikala, što je potvrđeno u mnogim bolestima CNS-a (Hantingtonova bolest, Multipla skleroza, Parkinsonova bolest) (5). Slobodni radikali imaju sposobnost oštećenja skoro svih biomolekula u ćeliji, narušavanja međumolekulskih veza i poremećaja fluidnosti i propustljivosti ćelijske plazma membrane (6). Nastajanje hidrosilnih radikala (OH[·]), najreaktivnijih kiseoničnih radikala, vezano je za Haber-Weiss-ovu reakciju u kojoj reaguju H₂O₂ i O₂^{·-}, kao i za Fenton-ovu reakciju koja se odnosi na razgradnju H₂O₂ u prisustvu metala sa promenljivom valencom (Fe²⁺ i Cu⁺) (7).

Sekundarni produkti lipidne peroksidacije, posebno malondialdehid (MDA), poseduju izrazite citotoksične efekte. Reakcija između MDA i proteina, RNA, DNA ili fosfolipida može dovesti do kovalentne modifikacije ovih supstrata i posledič-

nog oštećenja ćelijskih membrana i intracelularnih makromolekula (8). Poliamini (spermin, spermidin i putrescin) su prirodne alifatične baze prisutne u svim tkivima (9). Nalaze se u velikim količinama u nervnom tkivu. Nivo spermidina je najveći u beloj masi. Spermin ne pokazuje promenu sadržaja u raznim delovima mozga, dok je koncentracija putrescina najveća u kori velikog mozga, hipotalamusu, cerebelumu i kičmenoj moždini (10). Dokazano je da su ćelije mozga osetljive na smanjenje nivoa poliamina, sposobne da prepoznaju pad njihove koncentracije i da pokrenu regulatorne mehanizme, čiji je krajnji cilj održavanje normalnog nivoa ovih jedinjenja (11).

Putrescin nastaje dekarboksilacijom ornitina, pod dejstvom specifične ornitin dekarboksilaze (ODC). Drugi put biosinteze putrescina podrazumeva dekarboksilaciju L-arginina pod dejstvom arginin dekarboksilaze (ADC), pri čemu nastaje agmatin. Putrescin iz agmatina može nastati na dva načina: direktno, pod dejstvom enzima agmatinaze, ili preko jednog intermedijernog produkta, N-karbamoil putrescina. Putrescin ima centralno mesto u biosintezi druga dva poliamina, spermidina i spermina (pomoću enzima spermidin i spermin sintaze). Katabolizam spermina i spermidina se odvija pod dejstvom enzima poliamin oksidaze (PAO) uz izdvajanje 3-acetamidopropanola i H₂O₂. Ovi produkti imaju citotoksična svojstva i učestvuju u pokretanju apoptoze (12).

Poliamini u fiziološkim koncentracijama ispoljavaju anti-oksidativno dejstvo, jer reaguju sa slobodnim radikalima nastalim u toku različitih ćelijskih zbivanja. Oni u interakciji sa fosfolipidima ćelijske membrane povećavaju stabilnost ovog supstrata za proces lipidne peroksidacije (13).

Cilj ovog istraživanja bio je da se u uslovima ekstrahepatične holestaze kod pacova ustanovi: intenzitet lipidne peroksidacije u moždanom tkivu (na osnovu merenja nivoa MDA) i moguće zaštitno delovanje putrescina u ublaživanju oštećenja mozga u holestazi.

Materijal i metode

Materijal

Eksperiment je izveden na belim pacovima Wistar soja, muškog pola, starosti 5 meseci, težine od 250 do 300 g. Eksperimentalna holestaza izazvana je postupkom podvezivanja ductus choledochusa - hiruškim koncem, u Ketamin anesteziji (aplikovan je intraperitonealno, u dozi od 2 ml/kg TM), uz mere dezinfekcije i sterilizacije.

Eksperimentalne životinje su bile podeljene u 5. eksperimentalnih grupa:

I grupa (kontrolna) - Pacovima je intraperitonealno (i.p.) aplikovano po 1,0 ml fiziološkog rastvora, svakodnevno u toku 9 dana.

II grupa (lažno operisani) - Životinjama je u anesteziji (Ketamin, 2 ml/kg TM), bila otvarana i zatvarana abdominalna duplja, bez izvođenja operacije podvezivanja ductus choledochusa, da bi se eliminisali efekti same operacije na ispitivane parametre. Takođe, i njima je svakodnevno (9 dana) bio aplikovan fiziološki rastvor.

III grupa (putrescin) - Životinje su dobijale putrescin dihidrohlorid ("Sigma"), intraperitonealno, u dozi od 150 mg/kg TM, svakodnevno - 9 dana.

IV grupa (holestaza) - U prva 2 dana eksperimenta, pacovima je intraperitonealno aplikovan fiziološki rastvor, a zatim je izvršena operacija (podvezivanja ductus choledochusa) uz nastavak davanja 0,9% NaCl naredna 7 dana, svakodnevno.

V grupa (holestaza + putrescin) - Prva 2 dana eksperimenta životinjama je intraperitonealno aplikovan putrescin dihidrohlorid (150 mg/kg TM), a zatim je izvršeno podvezivanje ductus choledochusa uz nastavak aplikacije putrescina, naredna 7 dana (u istoj dozi).

Životinje su žrtvovane nakon 9 dana eksperimenta u Ketamin anesteziji (2 ml/kg TM), posle gladovanja od 15 sati.

Krv je uzimana punkcijom iz aorte abdominalis, nakon medijalne laparatomije. Heparinizirana krv je centrifugirana na 3000 ob/min, a izdvojena plazma je do analiza čuvana na -20 °C.

Za biohemijska ispitivanja uziman je mozak, koji je višestruko ispiran u hladnom izotoničnom rastvoru NaCl, odmah zamrzavan na -20°C i tako čuvan do homogenizovanja. Zatim je pripreman 20%-ni homogenat mozga u destilovanoj vodi na 0 °C. Homogenizovanje tkiva je vršeno Poter-ovim homogenizatorom sa teflonskim tučkom.

Biohemijski parametri

Ukupni, direktni i indirektni bilirubin. Nivo ukupnog, direktnog i indirektnog bilirubina u plazmi određivan je gotovim testom firme Ellitech na aparatu BTS-370 (BioSystems) (14).

Žučne kiseline. Ukupne žučne kiseline u plazmi, određivane su enzimskom kolorimetrijskom metodom po Mashige-u (15).

Lipidna peroksidacija. Nivo malondialdehida (MDA), krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije u moždanom tkivu, određivan je reakcijom s tio-barbiturnom kiselinom (TBA) (16).

Poliamin oksidaza (PAO). Aktivnost PAO u mozgu, određivana je spektrofotometrijskom metodom po Buchrach-u i Reches-u (17), na bazi merenja količine stvorenog aminoaldehida (18).

Proteini. Količina ukupnih proteina u moždanom tkivu, određivana je metodom po Lowry-u (19).

Statističke metode

Rezultati su obrađeni korišćenjem Student-ovog t-testa, a sve merne veličine su izražavane kao srednja vrednost ± SD. Obrada dobijenih podataka izvršena je korišćenjem statističkog programskog paketa-Statistical Package for Social Science (SPSS) softve-rom, verzija 11,0 u Windows 2000 okruženju, pri čemu su rezultati prikazani tabelarno i grafički.

Rezultati

U cilju procene efekta podvezivanja ductus choledochusa i stepena ekstrahepatične holestaze određivana je koncentracija bilirubina

(ukupnog, direktnog i indirektnog), kao i nivo ukupnih žučnih kiselina u krvnoj plazmi pacova. U grupi pacova sa holestazom nađeno je značajno povišenje vrednosti bilirubina (ukupnog, direktnog i indirektnog) i ukupnih žučnih kiselina, u odnosu na lažno operisane životinje (Tabela 1 i 2). Aplikovanje putrescina pacovima sa holestazom dovodi do značajnog sniženja nivoa bilirubina (ukupnog, direktnog i indirektnog) i ukupnih žučnih kiselina u plazmi, u odnosu na vrednosti u holestazi. Intenzitet lipidne peroksidacije, izražen na osnovu nivoa MDA u moždanom tkivu, zna-

čajno se povećava u toku eksperimentalne holestaze (4.98 ± 0.54 vs. lažno operisani 3.99 ± 0.32 nmol/mg proteina; $p < 0.001$). Ukoliko se životinjama sa ekstrahepatičnom holestazom intra-peritonealno daje putrescin, u mozgu se snižava stepen lipidne peroksidacije (2.25 ± 0.42 vs. 4.98 ± 0.54 nmol/mg proteina; $p < 0.001$) (Grafikon 1).

Kod pacova sa holestazom aktivnost PAO u moždanom tkivu je značajno povećana, u odnosu na lažno operisane životinje (1.25 ± 0.09 vs. 0.81 ± 0.09 U/mg proteina; $p < 0.001$).

Tabela 1. Koncentracija bilirubina (ukupnog, direktnog i indirektnog) u krvnoj plazmi pacova

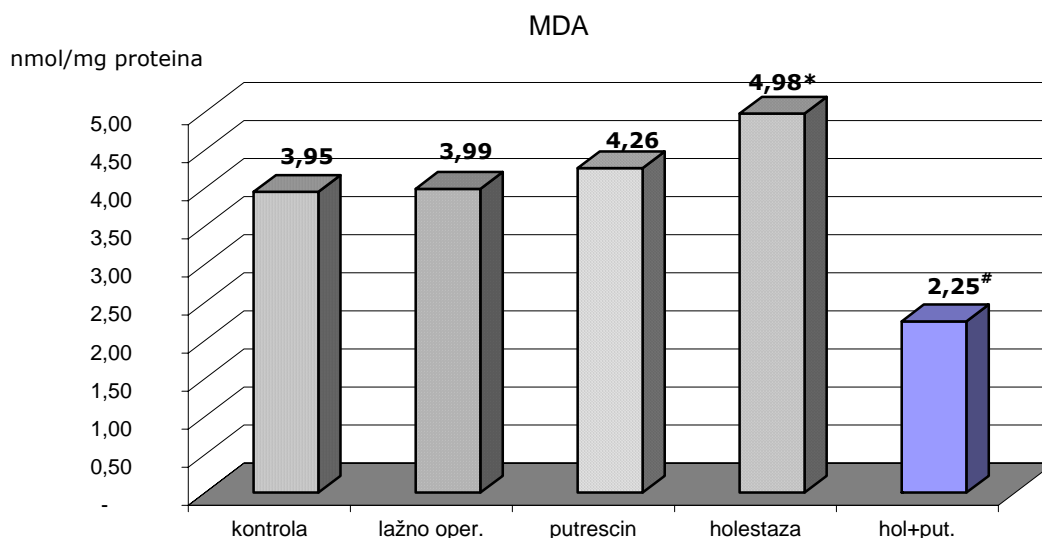
bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	kontrola	lažno operisani	putrescin	holestaza	holestaza + putrescin
ukupni	2.01 ± 0.4	3.5 ± 0.3	7.1 ± 0.3	$112.7 \pm 13.2^*$	$78.4 \pm 4.5^\#$
direktni	0.81 ± 0.2	0.9 ± 0.2	2.4 ± 0.5	$69.1 \pm 7.1^*$	$49.2 \pm 3.2^\#$
indirektni	1.20 ± 0.3	2.6 ± 0.4	4.7 ± 0.5	$43.6 \pm 5.9^*$	$29.2 \pm 3.3^\#$

* $p < 0.001$ (vs. lažno operisani), $^\#p < 0.001$ (vs. holestaza)

Tabela 2. Vrednosti ukupnih žučnih kiselina u krvnoj plazmi eksperimentalnih životinja

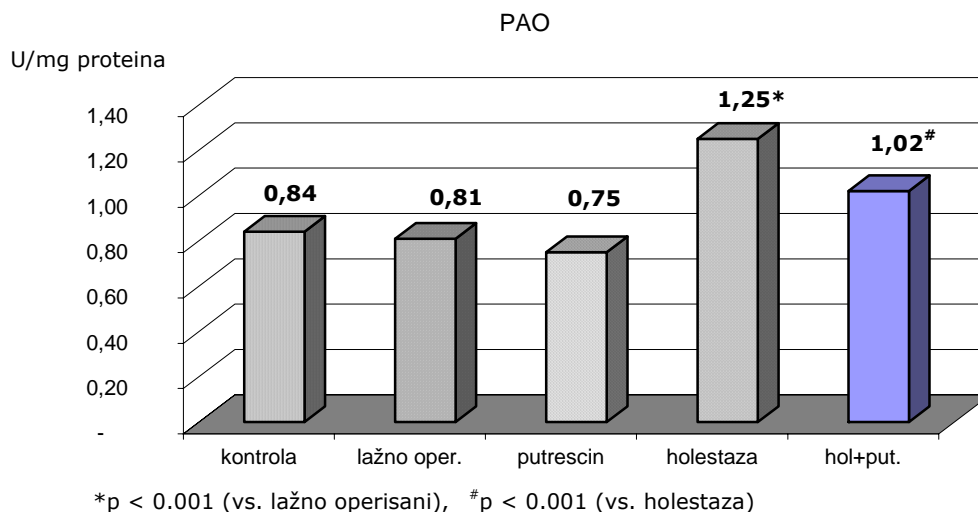
ukupne žučne kiseline	kontrola	lažno operisani	putrescin	holestaza	holestaza + putrescin
žučne kiseline ($\mu\text{mol/l}$)	3.9 ± 0.7	3.0 ± 0.5	3.9 ± 0.7	$22.8 \pm 2.6^*$	$11.4 \pm 0.8^\#$

* $p < 0.001$ (vs. lažno operisani), $^\#p < 0.001$ (vs. holestaza)

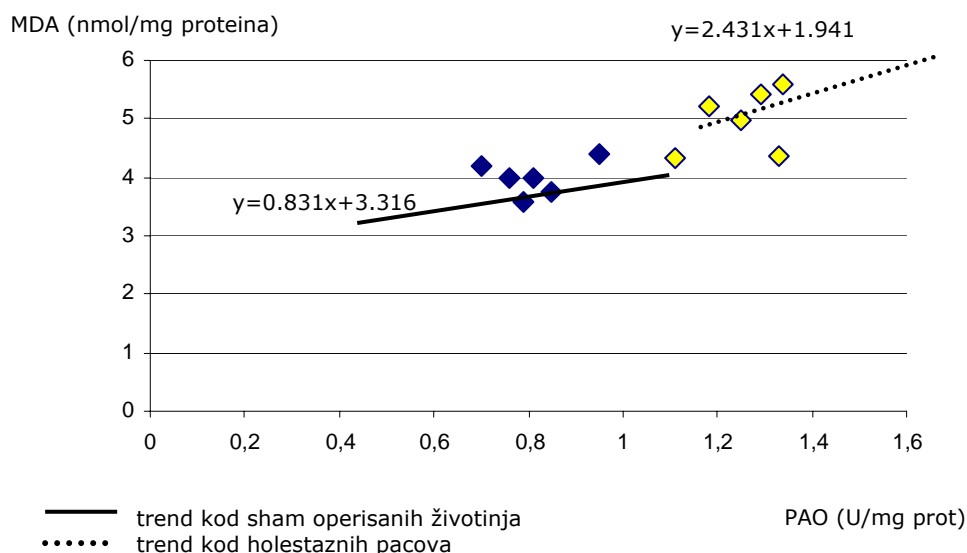


* $p < 0.001$ (vs. lažno operisani), $^\#p < 0.001$ (vs. holestaza)

Grafikon 1. Nivo malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu pacova



Grafikon 2. Aktivnost poliamin oksidaze (PAO) u mozgu pacova



Grafikon 3. Linearni regresioni trend nivoa MDA i aktivnosti PAO u moždanom tkivu holestaznih i lažno operisanih pacova

Administracija putrescina pacovima sa holestazom, dovodi do smanjenja aktivnosti ovog enzima u tkivu mozga (1.02 ± 0.07 vs. 1.25 ± 0.09 U/mg proteina; $p < 0.001$) (Grafikon 2).

Linearni regresioni trend izmedju nivoa MDA i aktivnosti PAO u moždanom tkivu holestaznih i lažno operisanih pacova pokazuje različiti korelacioni odnos, tj. različitu međuzavisnost. U uslovima holestaze značaj PAO, kao nezavisno promenjive, raste (porast aktivnosti PAO biva praćen većim stepenom lipidne peroksidacije), što ukazuje na veliki značaj aktivnosti PAO na povećanje nivoa MDA u mozgu holestaznih pacova (Grafikon 3).

Diskusija

Povećanje vrednosti konjugovanog bilirubina u plazmi u holestazi, posledica je povećanog

koncentracionog gradijenta između ćelija i plazme ili izlaska bilirubina usled ćelijskog oštećenja (20). Za razliku od konjugovanog koji je netoksičan, nekonjugovani bilirubin u slobodnom stanju veoma je toksičan za ćelije. Ukoliko on nije vezan za albumine plazme, može da prođe u intracelularni prostor, pošto se rastvara u lipidima ćelijske membrane. Organski anjoni kao što su žučne kiseline, konkurišu sa bilirubinom za vezujuća mesta za albumine. Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj studiji može se pretpostaviti da usled sedmostrukog porasta nivoa ukupnih žučnih kiselina (koje konkurišu bilirubinu za vezujuća mesta za albumine) u plazmi holestaznih životinja, deo nekonjugovanog bilirubina se može naći u slobodnom stanju i ispoljavati neurotoksične efekte.

U holestazi, povećana koncentracija žučnih kiselina u krvi i njena jaka deterdžentna svojstva,

mogu dovesti do poremećaja propustljivosti i strukture krvno-moždane barijere (21). Na taj način su stvoreni uslovi za delovanje toksičnog nekonjugovanog bilirubina na osetljivi moždani parenhim, izazivajući apoptozu neurona (22). Narušavanjem integriteta ove barijere prvo stradaju endotelne ćelije, a zatim i glija koja ih obavlja. Ove promene su najpre reverzibilne, a zatim dobijaju nepovratni karakter, u zavisnosti od koncentracije žučnih kiselina (23). Na nivou subcelularnih struktura mozga, pokazano je da nekonjugovani bilirubin dovodi do inhibicije respiratornog lanca, sinteze DNK i proteina, a on je i inhibitor fosforilacije proteina (22).

Ovi procesi se završavaju apoptozom ili nekrozom ćelija mozga. Patohistološki, u nekrozi, dominira formiranje vakuola, oštećenje plazma membrane uz oslobađanje plazma-membranskih konstituenata (praćenim gubitkom funkcije nerвне ćelije), a takođe se registruje i precipitacije bilirubina u ćelijskoj membrani. Apoptoza, koju izaziva nekonjugovani bilirubin i stimuliše povećana koncentracija žučnih kiselina, karakteriše se kondenzacijom ćelijske strukture, nuklearnom fragmentacijom i na kraju formiranjem apoptotičkih telašaca (24).

Nedavno je dokazano da se oštećenje CNS-a delovanjem bilirubina ostvaruje putem NMDA receptora (25). Neurotoksičnost bilirubina ispoljava se stimulacijom NMDA receptora, inhibicijom transporta elektrona u respiratornom lancu mitohondrija i smanjenjem ćelijske energije, što dovodi do ekscitotoksičnog oštećenja mozga (26).

Mehanizmi preko kojih je proces intenzivnog oksidativnog stresa doprineo poremećaju funkcije mozga, najverovatnije su delom zajednički sa prisutnim efektima na tkivo jetre, a delom i specifični. Ova specifičnost se ogleda u potencijalno većoj vulnerabilnosti ovog tkiva na oksidativni stres. Dokazano je da se primarne promene dešavaju u strukturi neurona, a da su kasnije praćene promenama u glijalnim i endotelnim ćelijama. Serban i sar. (27) su pokazali da koncentracija MDA u tkivu mozga pozitivno korelira sa stepenom ishemičnog oštećenja moždanog tkiva. Neke strukture mozga (globus pallidus, substantia nigra, hypothalamus), su posebno osetljive na povećanu produkciju reaktivnih OH· radikala.

U uslovima dugotrajne holestaze, žučne kiseline prodiru u moždano tkivo, gde povećavaju produkciju slobodnih radikala i intenziviraju lipidnu peroksidaciju. Dokazano je da žučne kiseline mogu da poremete transport elektrona u respiratornom lancu mitohondrija i time dovedu do "curenja" elektrona u trećem kompleksu respiratornog lanca, podstičući formiranje superoksidnih anjon radikala (O_2^-) i njihovih metabolita (28). Hidrofobne žučnih kiselina dovode do promene permeabiliteta mitohondrijalne membrane (MPT), a posledično i do gubitka potencijala mitohondrijalne membrane ($\Delta\Psi_m$) i time do prekida respiratornog lanca i inhibicije sinteze ATP-a, a sve to rezultuje proizvodnjom reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS) kulminišući nekrozom ili apoptozom (29). Yerushalmi i sar. (30) su zabeležili da i relativno niske koncentracije žučnih kiselina dovode do oksidativnog stresa u ćelijama

(koji prethodi apoptozi), a takođe je primećena značajna pozitivna linearna koleracija između apoptoze i nivoa MDA.

U *in vitro* studiji Sreejayana i sar. (31), dokazano je da taurodeoksikholna hidrofobna žučna kiselina dovodi do porasta nivoa lipidne peroksidacije izazvane Fe^{2+} . Ovaj porast je bio trostruki tokom početne faze inkubacije, što može da sugeriše da žučne kiseline mogu da pokrenu inicijaciju i lančanu propagaciju peroksidacije. Hidrofobne žučne kiseline interaguju sa Fe^{2+} na način koji gvožđe čini dostupnijim lipidnoj membrani, čime se promovise stvaranje OH· putem Fenton-ove reakcije i konačno lipidne peroksidacije (31).

U mnogobrojnim studijama dokazana je anti-oksidativna aktivnost poliamina (13, 32). Ha i sar. (33) su dokazali da poliamini deluju anti-oksidativno, kao „skavengeri“ (čistači) slobodnih radikala kiseoničnog porekla ili kao helatori Fe^{2+} , koji stvara OH·. Drolet i sar. (34) su objavili podatke koji sugerišu da su membrano-stabilizujući efekti poliamina rezultat i njihove mogućnosti da direktno reaguju sa slobodnim radikalima. Pavlović i sar. (35) su potvrdili da poliamini reaguju sa slobodnim radikalima kiseoničnog porekla u stanjima povećanog oksidativnog stresa. Takođe, dokazano je da poliamini sprečavaju oštećenje DNK, limitirajući ulazak Cu^{2+} u Fenton-ovu reakciju (36).

Poliamini, pošto su hidrosolubilna jedinjenja, prolaze kroz hemato-encefalnu barijeru, pomoću specifičnih transportnih sistema.

Na osnovu prethodnih podataka i rezultata dobijenih u našoj eksperimentalnoj studiji može se potvrditi anti-oksidativno dejstvo putrescina, jer dovodi do inhibicije lipidne peroksidacije, reagujući sa slobodnim radikalima koji nastaju u oštećenim ćelijama mozga u holestazi.

Pri katabolizmu poliamina delovanjem enzima PAO, stvara se H_2O_2 (toksični radikal kiseoničnog porekla) koji može da ošteti proteine, DNK i lipide, kao i da pokrene apoptozu. Dokazano je da je poliaminska toksičnost direktna posledica H_2O_2 , proizvedenog katabolizmom poliamina (12).

Izvesni toksični efekti intermedijera katabolizma poliamina vezani su za mogućnost nastajanja MDA (37). 3-aminopropion aldehyd iz koga može nastati MDA, nastaje u ekvimolarnim odnosima delovanjem PAO na spermin i spermidin (38). Zbog toga, moglo bi se sa pravom očekivati da je porast ukupne koncentracije MDA u mozgu holestaznih životinja delom uslovljen i povećanim katabolizmom poliamina (spermina i spermidina). Kod životinja sa podvezanim ductusom choledochusom u ovoj studiji, porast aktivnosti PAO je praćen većim stepenom lipidne peroksidacije, što ukazuje na značaj povećanja aktivnosti PAO na povećani nivo MDA u mozgu holestaznih pacova.

Intraperitonealno davan putrescin holestaznim pacovima prodire u cirkulaciju, a zatim i specijalnim transpornima u moždano tkivo gde sprečava porast aktivnosti poliamin oksidaze. Sprečavanjem porasta aktivnosti PAO kod životinja sa holestazom, putrescin onemogućava stvaranje

neurotoksičnih produkata katabolizma poliamina 3-acetamidopropanola, H₂O₂, MDA.

Zaključci

Na osnovu rezultata iznetih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

1. Eksperimentalna ekstrahepatična holestaza uslovlila je značajno povećanje aktivnosti specifičnih holestatskih supstrata (bilirubina i ukupnih žučnih kiselina) u krvnoj plazmi. Primena putrescina sprečava porast nivoa bilirubina i ukupnih žučnih kiselina u plazmi eksperimentalnih životinja sa holestazom.

2. Intenzitet lipidne peroksidacije, procenjen na osnovu merenja nivoa MDA, u tkivu mozga, pokazuje značajan porast kod pacova sa holestazom.

3. Holestaza dovodi do značajnog povećanja aktivnosti PAO u mozgu eksperimentalnih životinja.

4. Aplikovanje putrescina životinjama sa ekstrahepatičnom holestazom, sprečava pojavu oksidativnog stresa u moždanom tkivu. Takođe, putrescin sprečava porast aktivnosti PAO u mozgu pacova sa holestazom.

5. Davanje putrescina može se preporučiti u kliničkoj praksi za terapiju pacijenata sa holestatskim oštećenjem moždanog tkiva.

Literatura

- Kullak-Ublick G, Maier P. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2000; 4(2): 357-85.
- Schmucker DL, Ohta M, Kanai SI. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990;12(5): 1216-21.
- Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 1999; 117(3): 669-77.
- Bachrach U. Metabolism and function of spermine related amines. *Annu Rev Microbiol* 1970; 24: 109-34.
- Vert P, Grojean S, Daval JL. Combined neuronal toxicity of bilirubin and hypoxia. Study of cultures rat neurons *Bull Acad Natl Med* 2001; 185(8): 1417-26.
- Cross CE, Haiwel B, Barish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.
- Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(6): G992-G999.
- Sreejayan N, Von Ritter C. Lipid peroxidation in bile: the role of hydrophobic bile acids and the effect on biliary epithelial cell function. *Patophysiology* 1999; 5(4): 225-32.
- Mukai PH, Goldstein BD. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acid. *Science* 1976; 191: 868-9.
- Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 244-58.
- Shaw GG, Pateman AJ. The regional distribution of the polyamines spermine and spermine in brain. *J Neurochem* 1973; 20: 1225-30.
- Slotkin TA, Bartolome J, Persons D, Whitmore WL. Polyamines in brain and heart of the neonatal rat: effects of inhibitors of ornithine decarboxylase and spermidine synthase. *Life Sciences* 1984; 35: 1125-31.
- Pachment RE, Pierce GB. Polyamine oxidation, programmed cell death, and regulation of melanoma in the murine embryonic limb. *Cancer Res* 1989; 49: 6680-6.
- Tadolini B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. *Biochem J* 1988; 249: 33-6.
- Rosenthal P, Keefe MT, Henton D, Cheng M, Lee CR, Hall RL. Total and direct-reacting bilirubin values by automated methods compared with liquid chromatography and with manual methods for determining delta bilirubin. *Clinical Chemistry* 1990; 36: 788-91.
- Mashige F, Tanaka N, Maki A, Kamei S and Yamanaka M. Direct Spectrophotometry of Total Bile Acids in Serum. *Clin Chem* 1981. 27(8): 1352-6.
- Stroev EA, Makarova VG. Laboratory manual in biochemistry. Mir Publishers Moscow 1989; 251-5.
- Buchrach U, Reches B. Enzymatic Assay for Spermine and Spermidine. *Analytic Biochem* 1966; 17: 38-48.
- Quash G, Cologero H, Fossar N, Ferdinood A and Taylor D. Modification of diamine oxidase activity in vivo by metabolites of asparagine decarboxylation in normal and virus-transformed baby hamster kidney cells. *Biochem J* 1976; 157: 599-602.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-73.
- Zimmerman HJ. Intrahepatic Cholestasis. *Arch Intern Med* 1979; 139:1038-45.
- Green J, Beyar R, Bomzom L, Finberg JP, Better OS. Jaundice, the circulation and the kidney. *Nephron* 1984; 37: 145-2.
- Wennberg RP. The blood-brain barrier and bilirubin encephalopathy. *Cel Mol Neurobiol* 2000; 20(1): 97-109.
- Greenwood J, Adu J, Davey AJ, Abbott NJ, Bradbury MW. The effect of bile salts on the permeability and ultrastructure of the perfused, energy depleted rat blood brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 644-54.
- Hasen TWR, Allen JW. Oxidation of bilirubin by rat brain mitochondrial membranes-dependence on cell type and postnatal age. *Biochem Mol Med* 1997; 60: 155-60.
- Panahian N, Huang T and Maines MD. Enhanced neuronal expression of the oxidoreductase-biliverdin reductase-after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1999; 850: 1-13.
- Beal FM. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative diseases? *Ann Neurol* 1992; 31: 119-30.

28. Serban MG, Nita V. Lipid peroxidation and change of plasma lipids in acute ischemic stroke. Rom J Intern Med 1994; 32: 51-6.
29. Shivaram KN, Winklhofer-Roob BM, Straka MS et al. The effect of idebenone, a coenzyme Q analogue, on hydrophobic bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria. Free Radic Biol Med 1998; 25(4-5): 480-92.
30. Rodrigues CM and Steer CJ. Mitochondrial membrane perturbation in cholestasis. Hepatology 2000; 32: 135-41.
31. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW et al. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. Hepatology 2001; 33(3): 616-26.
32. Sreejayan N and Von Ritter C. Effect of bile acids on lipid peroxidation: the role of iron. Free Radical Biology and Medicine 1998; 25(1): 50-6.
33. Pavlović D. Proučavanje povezanosti peroksidacije lipida i katabolizma poliamina u različitim metaboličkim uslovima. Doktorska disertacija, Niš, 1991.
34. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppasamy JL, Zweier PM, Woster RA, Casero J. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11140-5.
35. Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL and Thompson JE. Radical scavenging properties of polyamines. Phytochemistry 1986; 25: 367-2.
36. Pavlović D, Uzunova P, Bjelaković G, et al. Polyamines as Modulators of Lipoperoxidation. Gen Physiol Biophys 1992; 11: 203-11.
37. Tadolini B, Cabrini L, Varani E and Pasquali P. Polyamine binding to phospholipid vesicles and inhibition of lipid peroxidation. Biochem Biophys Res Commun 1984; 122: 0-5555.
38. Quash G and Taylor DR. Serum β -aminopropionaldehyde: Identification and origin. Clin Chim Acta 1970; 30: 17-23.

EFFECT OF PUTRESCINE ON INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION IN RATS' BRAIN WITH CHOLESTASIS

Dusan Sokolovic, Gordana Bjelakovic, Jelenka Nikolic, Gordana Kocic, Boris Djindjic, Dusica Pavlovic, Stojan Radic, Jelena Basic and Marko Jovic

Encephalopathy in cholestasis results from accumulation of unconjugated bilirubin (UCB) and hydrophobic bile acids (BA). Toxic BA and UCB induces neurotoxicity (apoptosis of neurons). Putrescine, spermidine and spermine are endogenous polyamines essential for cellular growth, regeneration and differentiation. Beneficial effects of putrescine in CNS injury have been attributed to anti-apoptotic and anti-oxidant properties.

The aim of the study was to examine the effect of putrescine at the level of lipid peroxidation in cholestatic brain injury.

Wistar rats were divided into 5 groups: I-control, II-sham operated rats, III-treated only with putrescine, IV-bile duct ligated (BDL) rats, V-BDL rats treated with putrescine (150mg/kg BW ip.). The animals were sacrificed after the 9-day treatment.

Administration of putrescine in BDL rats reduces concentration of blood plasma UCB and BA (29.2 \pm 3.3 vs. 43.6 \pm 5.9 μ mol/l and 11.4 \pm 0.8 vs. 22.8 \pm 2.6 μ mol/l; $p < 0.001$). The lipid peroxidation (MDA) was increased in brain of BDL rats (4.98 \pm 0.54 vs. sham operated rats 3.99 \pm 0.32 nmol/mg prot; $p < 0.001$). Putrescine decreased MDA level in brain of V group vs. IV group rats (2.25 \pm 0.42 vs. 4.98 \pm 0.54 nmol/mg p; $p < 0.001$). The amplification of cerebral activity of polyamine oxidase (PAO) in BDL rats (1.25 \pm 0.09 vs. sham operated rats 0.81 \pm 0.09 U/mg prot; $p < 0.001$), resulted in high local concentrations of 3-acetamidopropanol and H₂O₂ which lead to oxidative stress and cell death. Administration of putrescine of BDL rats, decreased activity of cerebral PAO compared with BDL rats (1.02 \pm 0.07 vs. 1.25 \pm 0.09 U/mg prot; $p < 0.001$).

Administration of putrescine in BDL rats results in normalization of cerebral oxidative stress and has protective role after the CNS injury in cholestasis. *Acta Medica Medianae 2006;45(2):45-51.*

Key words: putrescine, lipid peroxidation, cholestasis, brain