

УДК:636.5/6:612.176:519.11.57.085

ВМІСТ ПОЛІАМІНІВ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ У КРОВІ ТА ТКАНИНАХ КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ ЗА УМОВ СТРЕСУ

С. С. Грабовський
grbss@ukr.net

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів, 79010, Україна

У статті представлені результати дослідження вмісту поліамінів у крові та деяких тканинах (печінка, селезінка, нирки і грудний м'яз) курчат-бройлерів у стресі перед забоєм. Птиці дослідних груп за п'ять днів до забою додатково до основного раціону вводили аерозольним методом екстракт селезінки (70°спиртовий розчин об'ємом 1,4 мл на курча), одержаний з використанням та без застосування ультразвуку. Курчатам-бройлерам контрольної групи за п'ять днів до забою до корму додавали 70°спиртовий розчин в аналогічному об'ємі.

У крові та тканинах курчат-бройлерів досліджували вміст поліамінів: путресцину, сперміну та спермідину. Додаткове введення поліамінів, отриманих з екстракту селезінки як із застосуванням, так і без використання ультразвуку, супроводжувалось вірогідним підвищенням загальної кількості поліамінів, а також збільшенням концентрації окремих із них: путресцину, сперміну та спермідину в крові і тканинах (крім нирок) курчат-бройлерів. Найнижчий рівень путресцину, сперміну та спермідину був у крові і деяких тканинах курчат-бройлерів контрольної групи. Вірогідно більший вміст поліамінів спостерігали у крові, печінці та грудному м'язі у курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким додатково до основного раціону вводили екстракт селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку.

Дослідження і з'ясування впливу поліамінів (путресцину, спермідину та сперміну), одержаних із селезінки з використанням ультразвуку, на імунологічні показники крові сільськогосподарських тварин та птиці з метою підвищення природної резистентності їх організму, попередження та корекції передзабійного стресу будуть перспективними.

Ключові слова: ПОЛІАМІНИ, ПЕРЕДЗАБІЙНИЙ СТРЕС, ЕКСТРАКТ СЕЛЕЗІНКИ, УЛЬТРАЗВУК, КУРЧАТА-БРОЙЛЕРИ

POLYAMINES CONTENT AND ITS CORRECTION IN BROILER CHICKENS BLOOD AND TISSUES AT PRE-SLAUGHTER STRESS

S. S. Grabovskiy
grbss@ukr.net

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named
after S. Z. Gzhytskyj, Pekarska st., 50, Lviv, 79010, Ukraine

The data about content of polyamines in broiler chickens blood and some tissues (liver, spleen, kidneys and thoracic muscle) at pre-slaughter stress are presented in the article. The spleen extract (70°alcohol solution in volume 1.4 ml per chicken) was added to the diet of broiler chickens of experimental groups by aerosol method. This extract was obtained with and without ultrasound application. 70°alcohol solution in the same volume and the same method was added to the diet of broiler chickens of control group five days before slaughter. The content of polyamines such as putrescin, spermine and spermidin in broiler chickens blood and some tissues was determined. The total amount of polyamines and concentration of putrescin, spermine and spermidin in broiler chickens blood and some tissues (except kidneys) was reliable

higher compared to control after additional supplementary of the spleen extract to the diet of broiler chickens of experimental groups by aerosol method.

The putrescin, spermine and spermidin level was reliable lowest in blood and some tissues of broiler chickens of control group. The polyamines content in broiler chickens blood, liver and thoracic muscle was reliable highest in broiler chickens of the first experimental group after addition to the diet of the spleen extract with ultrasound application.

The investigations of the influence of polyamines such as putrescin, spermine and spermidin which was obtained from spleen with ultrasound application on farm animals and poultry immune status for organism resistance increasing and correction of negative impact of pre-slaughter stress will be prospects.

Keywords: POLYAMINES, PRE-SLAUGHTER STRESS, SPLEEN EXTRACT, ULTRASOUND, BROILER CHICKENS

СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИАМИНОВ И ИХ КОРРЕКЦИЯ В КРОВИ И ТКАНЯХ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

С. С. Грабовский
grbss@ukr.net

Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

В статье представлены результаты исследования содержания полиаминов в крови и некоторых тканях (печень, селезенка, почки и грудная мышца) цыплят-бройлеров в стрессе перед убоем. Птице опытных групп за пять дней до убоя дополнительно к основному рациону вводили аэрозольным методом экстракт селезенки (70°спиртовый раствор в объеме 1,4 мл на цыпленка), полученный с использованием и без применения ультразвука. Цыплятам-бройлерам контрольной группы за пять дней до убоя таким же способом к корму добавляли 70°спиртовый раствор в аналогичном объеме.

В крови и тканях цыплят-бройлеров исследовали содержание полиаминов: путресцина, спермина и спермидина. Дополнительное введение полиаминов, полученных из экстракта селезенки, как с использованием так и без применения ультразвука, сопровождалось достоверным повышением общего количества полиаминов, а также увеличением концентрации отдельных из них: путресцина, спермина, спермидина в крови и тканях (кроме почек) цыплят-бройлеров. Самый низкий уровень путресцина, спермидина и спермина отмечен в крови и некоторых тканях цыплят-бройлеров контрольной группы. Достоверно высшее содержание полиаминов наблюдали в крови, печени и грудной мышце у цыплят-бройлеров первой опытной группы, которым дополнительно к основному рациону вводили экстракт селезенки полученный с применением ультразвука.

Перспективными будут исследования влияния полиаминов (путресцина, спермидина и спермина), полученных из селезенки с использованием ультразвука, на иммунологические показатели крови сельскохозяйственных животных и птицы с целью повышения естественной резистентности их организма, предупреждения и коррекции передубойного стресса.

Ключевые слова: ПОЛИАМИНЫ, ПЕРЕДУБОЙНЫЙ СТРЕСС, ЭКСТРАКТ СЕЛЕЗЕНКИ, УЛЬТРАЗВУК, ЦЫПЛЯТА-БРОЙЛЕРЫ

Путресцин, спермін і спермідин — аліфатичні полікаїони, які належать до біологічно активних амінів, виявлені у всіх живих організмах (у тварин і рослин, у водоростях і грибах, у бактеріях і вірусах). Тканини еукаріот містять спермін

та спермідин в мілімолярних концентраціях, тоді як кількість путресцину у них знайдено у наномольних концентраціях. Кількість поліамінів у тканинах тварин залежить від виду тканини, швидкості її росту, віку та

багатьох інших факторів. Найбільшу концентрацію поліамінів виявлено у підшлунковій залозі, тимусі та інших залозах, а також у печінці, тобто в органах, де відбувається інтенсивний синтез білків [1, 2]. У багатьох лабораторіях досліджували внутрішньоклітинний розподіл поліамінів [3–6], їх вміст у м'ясі курей, свиней та великої рогатої худоби [7].

У жіночому грудному молоці дуже багато поліамінів (особливо сперміну), тому, на думку вчених, завдяки ним жіноче молоко має протиалергенні властивості [8]. За останні роки є багато літературних публікацій, присвячених ролі дисбалансу поліамінів у патогенезі різних захворювань та патологічних станів у тварин і людей, особливо неврологічного характеру [9–12]. Окремі науковці розглядають поліаміни як харчові добавки, що мають оздоровчі властивості [13–16]. Поліаміни синтезуються майже усіма клітинами ссавців [17, 18], все ж їх накопичення необхідно підтримувати у певні періоди [19, 20] і, зокрема у стресових ситуаціях. У Швеції щодо дієтичного харчування особлива увага приділяється вмісту поліамінів у продуктах харчування і, зокрема у молоці [21].

Високий внутрішньоклітинний вміст та різноманітність життєво важливих функцій поліамінів дозволяє розглядати їх як низькомолекулярні регулятори клітинного метаболізму, особливо у стресових ситуаціях, у тому числі перед забоєм тварин та птиці. Тому нами була поставлена мета встановити вміст пугресцину, сперміну, спермідину, їх кореляцію у крові і тканинах курей-бройлерів з врахуванням передзабійного стресу та додаткового введення до корму екстракту селезінки, багату на поліаміни.

Матеріали і методи

Дослід провели на 15 курчатах-бройлерах, які утримувалися на стандартному раціоні ТЗОВ «Великолюбінське» смт. Великий Любінь Городоцького району Львівської області.

Для дослідження було сформовано три групи птиці одномісячного віку (по 5 курчат у кожній).

Як біологічно активні речовини у передзабійний період (за п'ять діб до забою) використовували спиртовий екстракт селезінки, одержаний із застосуванням ультразвуку (перша дослідна група) та без використання ультразвуку (друга дослідна група). Екстракти наносили на комбікорм аерозольним методом (70° спиртовий розчин об'ємом 1,4 мл на курча). Птиці контрольної групи (третья група) таким же чином додавали до корму 70° спиртовий розчин в аналогічному об'ємі. Контроль за поїданням комбікорму здійснювали щоденно. Забій птиці проводили у ранковий час. Для біохімічних досліджень брали кров і тканини печінки, селезінки, нирок, грудного м'яза.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з птицею здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [22].

Вміст поліамінів у біоматеріалі визначали методом рідинної хроматографії високого тиску (РХВТ) [23] на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США).

Зразки (500 мг тканини) гомогенізували в 1М розчині хлорної кислоти та залишали на добу у холодильнику, після цього центрифугували 30 хв при 16000 g. З кожного зразка відбирали надосадову фракцію, додавали по 300 мкл діетилового ефіру, інтенсивно перемішували та центрифугували 30 хв при 16000 g. Для подальшої роботи відбирали по 300 мкл кислотної фракції. До відібраної аліквоти додавали насичений розчин карбонату натрію з розрахунку 25 мкл карбонату на 100 мкл кислоти. Після цього

до кожного зразка додавали по 0,4 мкл розчину 5-диметиламіно-1-нафталін-сульфонілхлориду (Serva, США) в ацетоні у концентрації 5 мг/мл. Залишали зразки на 20 год за кімнатної температури у темному місці для дансильовання поліамінів. Потім до зразків додавали по 400 мкл циклогексану та інтенсивно перемішували для екстракції дансильованих ПА, центрифугували 10 хв при 16000 g. Відбирали фракцію циклогексану та переносили її у тиглі для вакуумного сушіння. Процедуру із циклогексаном повторювали тричі. Циклогексанові фракції висушували у вакуумній сушарці за кімнатної температури у темряві. Осад, що залишився, розчиняли в 400 мкл метанолу та фільтрували через фільтр PTFE-25-2 фірми Supelco з розмірами пор 0,2 мкм. Після цього проводили аналіз зразків на хроматографі.

Як стандарт застосовували еквімолярну суміш стандартних поліамінів (путресцин·2НСІ, спермідин·3НСІ, спермін·4НСІ, N₁-та N₈-ацетилспермідин, ацетилпутресцин, N₁-ацетилспермін) із розрахунку 25 пмоль на пробу. Суміш стандартів, попередньо розчинену в 1М перхлорній кислоті, готували аналогічно як дослідні зразки. У роботі використовували розчинники і стандарти поліамінів фірми Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Для аналізу зразків використовували колонку Daisopak SP-120-5-ODS-RPS (4,6 mm I.D.Ч 250 mm) фірми Daisoco Ltd. Аналізували аліквоти по 20 мкл кожного зразка в градієнті концентрації вода/ацетонітрил від 50 до 100 % протягом 20 хв та чистий ацетонітрил 5 хв при швидкості потоку 1 мл/хв. Рівень поліамінів визначали при довжині хвилі опромінювання 342 нм та емісії 512 нм. Рівень поліамінів розраховували у наномолях на 1 мг білка тканини.

Математичну обробку результатів опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Statistica 6.0 и Microsoft Excel for Windows XP. Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали достовірними при P < 0,05.

Результати й обговорення

Аналізуючи отримані дані щодо вмісту поліамінів перед забоєм у крові курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким до корму додавали екстракт селезінки, оброблений ультразвуком, встановлено, що загальна кількість поліамінів збільшилась порівняно з контролем на 39 % (P < 0,01) і, зокрема концентрація спермідину — на 34 % (P < 0,05), а сперміну — на 40 % (P < 0,01, рис. 1).

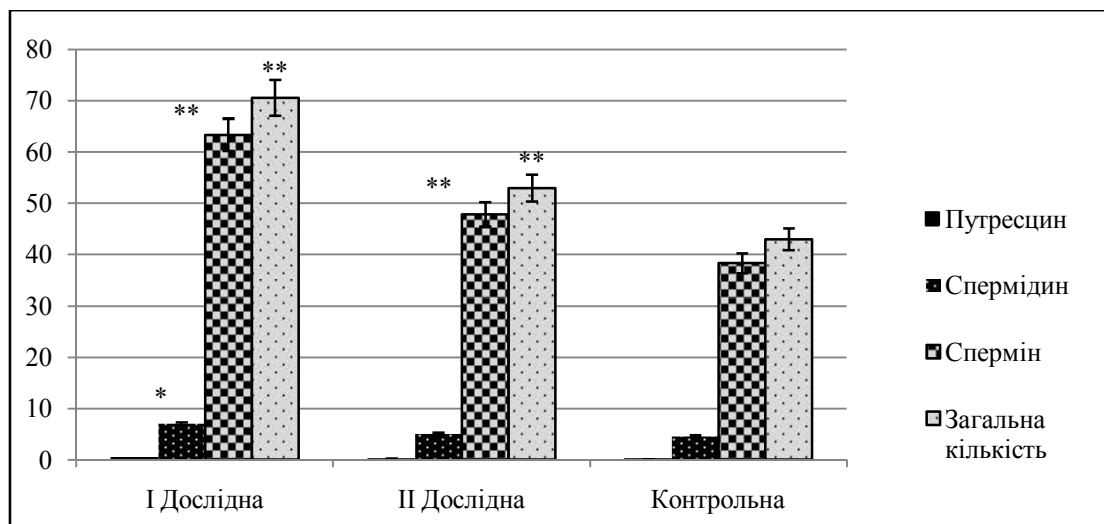


Рис. 1. Концентрація поліамінів у крові курчат-бройлерів, нмоль/мл тканини

Примітка: тут і у наступних рисунках * — P < 0,05; ** — P < 0,01

Отримані результати досліджень узгоджуються з даними авторів [24, 25], оскільки додаткове застосування поліамінів може впливати на їх концентрацію у тканинах та крові зокрема.

Аналізуючи вміст поліамінів у селезінці, відмічено зростання їх загальної кількості в обох дослідних групах: у курчат першої дослідної групи на 20 % ($P < 0,05$), другої — на 14 % ($P < 0,01$) та збільшення концентрації спермідину лише у курчат першої дослідної групи —

на 33 % ($P < 0,05$). Концентрація путресцину у селезінці курчат-бройлерів усіх експериментальних груп була практично на однаковому рівні (рис. 2).

Вірогідне підвищення рівня поліамінів у селезінці курчат обох дослідних груп пов'язане не тільки з додатковим введенням їх до раціону, але й з їх синтезом у селезінці, незважаючи на інтенсивніше використання цих поліамінів у передзабійному стресі.

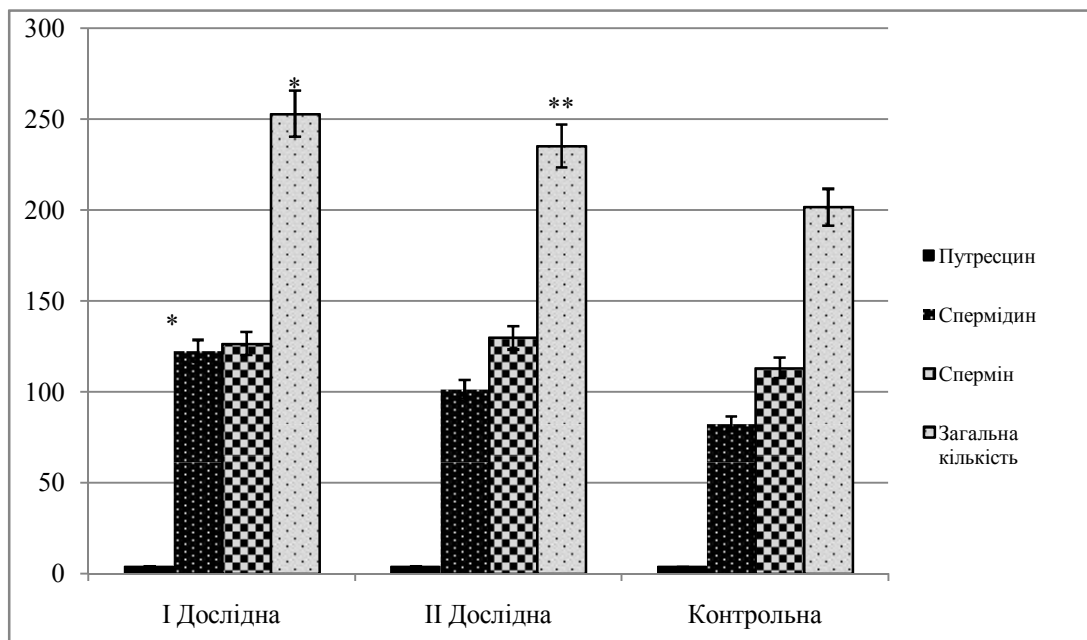


Рис. 2. Концентрація поліамінів у селезінці курчат-бройлерів, нмоль/мл тканини

Встановлено вірогідно більший ($P < 0,05$) вміст сперміну, спермідину та загальної кількості поліамінів у печінці курчат-бройлерів усіх дослідних груп порівняно з контролем.

Слід відмітити, що рівень путресцину у печінці у курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким додатково до корму аерозольно вводили екстракт селезінки, оброблений ультразвуком, був вірогідно вищим $4,756 \pm 0,847$ ($P < 0,05$) порівняно з контролем $2,469 \pm 0,872$ нмоль/мл тканини (рис. 3).

З літературних джерел відомо, що у малих кількостях поліаміни синтезуються

майже усіма клітинами організму [26], але основну частину ендогенних поліамінів синтезує печінка [27–30], що узгоджується з нашими дослідженнями.

Найбільший вміст поліамінів у печінці, ймовірно, пов'язаний з інтенсивнішим синтезом їх у стані стресу та з додатковим введенням до корму екстракту селезінки, що свідчить про необхідність підвищення концентрації поліамінів у раціоні сільськогосподарських тварин і птиці перед забоєм, оскільки поліаміни інтенсивно використовуються організмом за умов стресу.

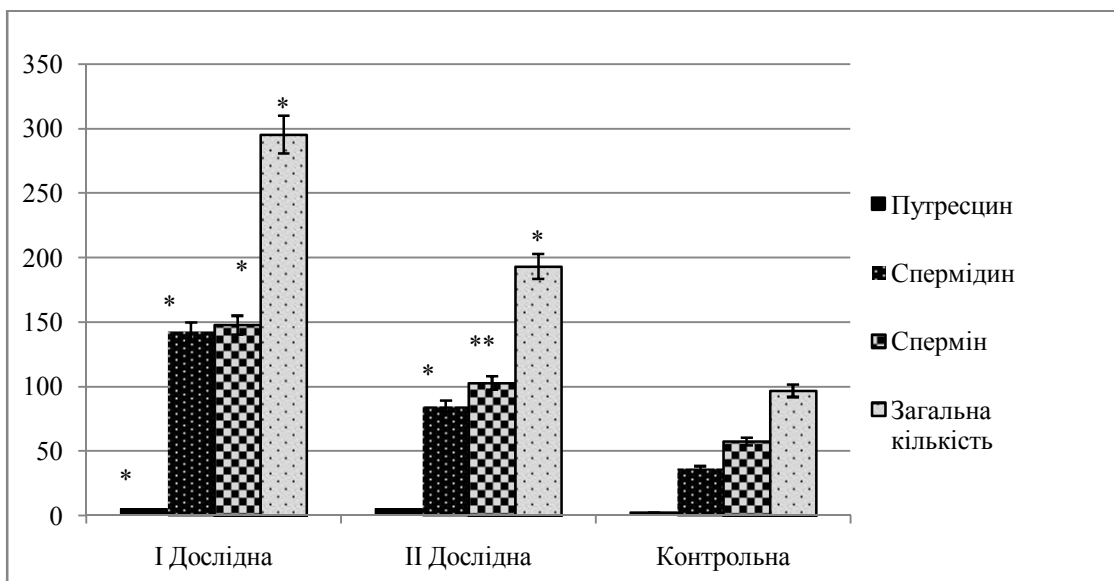


Рис. 3. Концентрація поліамінів у печінці курчат-бройлерів, нмоль/мл тканини

Встановлене вірогідне збільшення загальної кількості поліамінів у нирках курчат-бройлерів першої дослідної групи до $188,39 \pm 23,33$ ($P < 0,05$) та зменшення до $82,62 \pm 14,70$ ($P < 0,01$) — у курчат другої дослідної групи, порівняно з контролем, може вказувати на ефективність

застосування екстракту селезінки, отриманого під впливом ультразвуку. Відмічено вірогідно більший вміст сперміну (на 45 %) та спермідину (на 47 %) ($P < 0,05$) лише у нирках курчат-бройлерів першої дослідної групи (рис. 4).

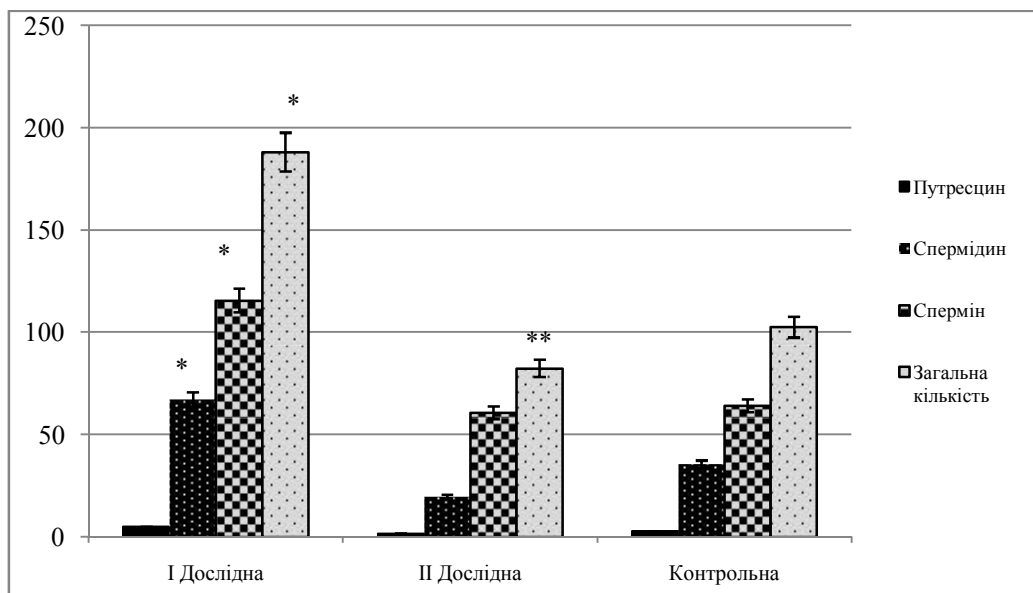


Рис. 4. Концентрація поліамінів у нирках курчат-бройлерів, нмоль/мл тканини

У курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким додатково до основного раціону вводили екстракт селезінки, одержаний із застосуванням ультразвуку, загальна кількість поліамінів

у грудному м'язі була більшою на 45 % ($P < 0,05$), тоді як у курчат другої дослідної групи — на 32 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис. 5).

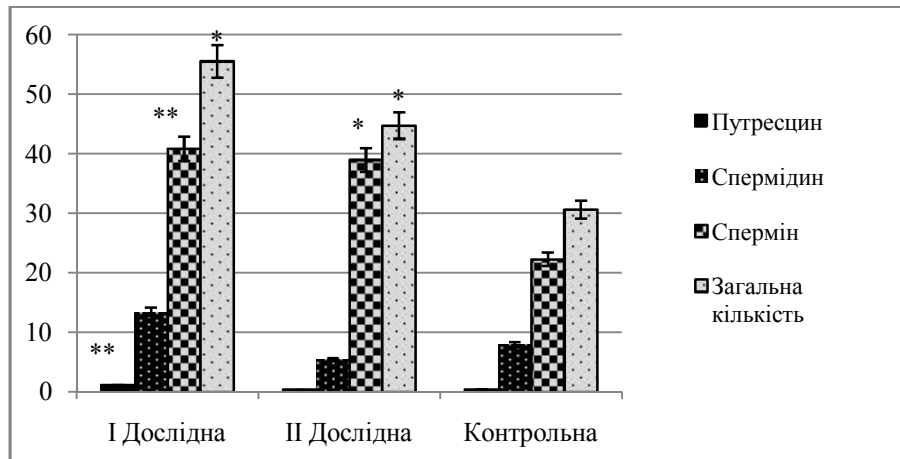


Рис. 5. Концентрація поліамінів в м'язі грудинки курчат-бройлерів, нмоль/мл тканини

Вміст путресцину у грудному м'язі курчат першої дослідної групи становив $1,12 \pm 0,42$ нмоль/мг тканини ($P < 0,01$), що є вірогідно більшим порівняно з аналогічним показником у курчат контрольної групи ($0,39 \pm 0,45$). Також встановлена вірогідно більша кількість сперміну у грудному м'язі обох дослідних груп курчат-бройлерів: на 45 % ($P < 0,01$) — перша дослідна група та 43 % ($P < 0,05$) — друга дослідна група порівняно з контролем. Концентрація спермідину була вірогідно більшою лише у курчат першої дослідної групи. Отже, узагальнюючи усі отримані дані, можна зробити наступні висновки.

Висновки

1. Додаткове введення поліамінів, отриманих з екстракту селезінки, як із застосуванням так і без використання ультразвуку, супроводжувалось підвищенням загальної кількості поліамінів, а також збільшенням концентрації окремих із них: путресцину, сперміну та спермідину у крові і тканинах (крім нирок) курчат-бройлерів.

2. Найнижчий рівень путресцину, спермідину та сперміну був у крові і тканинах курчат-бройлерів контрольної групи.

3. Вірогідно більший вміст поліамінів спостерігали у крові, печінці та грудному м'язі у курчат-бройлерів першої дослідної групи, яким додатково до основного раціону вводили екстракт

селезінки, отриманий із застосуванням ультразвуку.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому буде досліджено вплив поліамінів (путресцину, спермідину та сперміну), одержаних з селезінки з використанням ультразвуку, на імунологічні показники в крові курчат-бройлерів з метою підвищення природної резистентності та попередження передзабійного стресу.

1. Berdinskih P. K., Zaletok S. P. Poliaminy i opuholevyj rost [Polyamines and tumour growth]. K., Naukova, dumka, 1987. 140 p. (In Russian).

2. Scalabrino G., Ferioli M. E. Polyamines in mammalian tumors. *Advances in Cancer Research*. New York, Raven Press, 1981. Vol. 35. P. 151–268.

3. Menyhart J., Grof J. A termesztetes polyaminok biologiaja. *Biologia*, 1976, 24, № 2, p. 81–110.

4. Tabor C. W., Tabor H. 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.*, 1976, 45, № 1, p. 285–306.

5. Tabor C. W., Tabor H. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, 53, № 5, p. 749–790.

6. Casero R. A., Pegg A. E. In: Polyamines: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, LLC. 2011, 720, 3–35.

7. Rosinská D., Lehotay J. Influence of temperature on production of biogenic amines in pork, beef and poultry and their HPLC determination after postcolumn derivatization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2014, vol. 37, is. 5, 609–619.

8. Atiya Ali M., Strandvik B., Palme-Kilander C., Yngve A. Lower polyamine levels in breast milk of obese mothers compared to mothers with normal body weight. *Journal of Human*

Nutrition and Dietetics, 2013, vol. 26, is. 1, p. 164–170.

9. Hloponin D. P., Makljakov Ju. S., Krotova Ju. N., Karkishhenko V. N. Obmen poliaminov v miokarde pri modelirovanii regeneratorno-plasticheskoy serdechnoy nedostatochnosti u kryss [Polyamines metabolism in myocardium at the design of regenerator-plastic cardiac insufficiency for rats]. *Biomedicina — Biomedicine*, 2012, № 1, p. 10–15 (in Russian).

10. Adibhatla R. M., Hatcher J. F., Sailor K. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 2002, vol. 938, p. 81–86.

11. Igarashi K. Physiological functions of polyamines and regulation of polyamine content in cells. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2006, vol. 126, № 7, p. 455–471.

12. Moinard C., Cynober L., De Bandt J.-P. Polyamines: metabolism & implications in human diseases. *Clin. Nutr.*, 2005, vol. 24, p. 184–197.

13. Binh P. N. T., Soda K., Kawakami M. Gross domestic product and dietary pattern among 49 western countries with a focus on polyamine intake. *Health*, 2010, 2 (11), 1327–34.

14. Phan Nguyen Thanh Binh, Kuniyasu Soda, Chizuko Maruyama, Masanobu Kawakami. Relationship between food polyamines and gross domestic product in association with longevity in Asian countries. *Health*, 2010, vol. 2, No. 12, 1390–1396.

15. Ali MA, Poortvliet E, Strömberg R, Yngve A. Polyamines in foods: development of a food database. *Food Nutrition Research*, 2011, 55: 5572. DOI: 10.3402/fnr.v55i0.5572.

16. Ali M. A., Poortvliet E, Strömberg R, Yngve A. Polyamines: total daily intake in adolescents compared to the intake estimated from the Swedish Nutrition Recommendations Objectified (SNO). *Food Nutrition Research*. 2011, 55: 5455–DOI: 10.3402/fnr.v55i0.55455.

17. Bardocz S, Duguid T. J., Brown D.S. et al. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br J Nutr.* 1995, 73 (6), 819–28.

18. Loser C. Polyamines in human and animal milk. *Br J Nutr.*, 2000, 84, suppl 1, s. 55–80.

19. Bardocz S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci Technol.*, 1995, 6 (10), 341–6.

20. Loser C., Folsch U. R. Importance of various intracellular regulatory mechanisms of polyamine metabolism in camostate-induced

pancreatic growth in rats. *Digestion* 1993, 54 (4), 213–23.

21. Mohamed Atiya Ali. Polyamines in Foods and Human Milk. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. 2011. 67 p.

22. Official Journal of the European Union L276/33. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 86/609/EC. 20.10.2010.

23. Gerbaut L. Determination of Erythrocytic Polyamines by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Clin. Chem.*, 1991, v. 37, № 12, p. 2117–2120.

24. Brodal B. P., Eliassen K. A., Ronning H., Osmundsen H. Effects of dietary polyamines and clofibrate on metabolism of polyamines in the rat. *J. Nutr. Biochem.*, 1999, 10, 700–708.

25. Soda K., Kano Y., Sakuragi M., Takao K., Lefor A., Konishi F. Long-Term Oral Polyamine Intake Increases Blood Polyamine Concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2009, 55, 361–366.

26. Bardocz S., Duguid T. J., Brown D. S., Grant G., Pusztai A., White A., Ralph A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br J Nutr*, 1995, 73 (6), 819–28.

27. Jung Y. S., Kim S. J., Kwon do Y., Kim Y. C. Metabolomic analysis of sulfur-containing substances and polyamines in regenerating rat liver. *Amino Acids*. 2012; 42(6):2095-102. doi: 10.1007/s00726-011-0946-7.

28. Koponen T., Cerrada-Gimenez M., Pirinen E., Hohtola E., Paananen J., Vuohelainen S., Tusa M., Pirnes-Karhu S., Heikkinen S., Virkamäki A., Uimari A., Alhonen L., Laakso M. The activation of hepatic and muscle polyamine catabolism improves glucose homeostasis. *Amino acids*. 2012; 42(2–3):427-40. doi: 10.1007/s00726-011-1013-0.

29. Tomasi M. L., Ryoo M., Skay A., Tomasi I., Giordano P., Mato J. M., Lu S. C. Polyamine and Methionine Adenosyltransferase 2A Crosstalk in Human Colon and Liver Cancer. *Exp Cell Res*. 2013;319(12):1902-11. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.04.005.

30. Battaglia V., Tibaldi E., Grancara S., Zonta F., Brunati A.M., Martinis P., Bragadin M., Grillo M. A., Tempera G., Agostinelli E., Toninello A. Effect of peroxides on spermine transport in rat brain and liver mitochondria. *Amino Acids*. 2012;42(2-3):741-9. doi:10.1007/s00726-011-0990-3.