

Софийски Университет "Св. Климент Охридски"

Биологически факултет

Катедра Физиология на животните и човека

Милена Янкова Мишонова

**РЕГУЛАЦИЯ НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА
ДИАМИНООКСИДАЗА НА ПЛЪХ ОТ
ТЕСТОСТЕРОН, АМИНОГУАНИДИН, СИНТАЗИ
НА АЗОТЕН ОКСИД И ВЪГЛЕРОДНИ
НАНОЧАСТИЦИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“. Професионално направление 4.3. Биологични науки
(научна специалност Физиология на животните и човека)

Научен ръководител: проф. д-р Христо Гагов

София, 2018

Дисертационният труд се състои от 130 страници и съдържа 27 фигури и 5 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 305 заглавия, от които 3 са на кирилица и 302 – на латиница.

Дисертацията е разработена в лабораторията по Ендокринология към катедра Физиология на животните и човека на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Проведените изследвания са финансирани от проекти № 20/2015 г.; № 53/2016 г. и № 80-10-17/12.04.2017г. към фонд „Научни изследвания“ на СУ „Св. Климент Охридски“, и проект № BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г., финансиран от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“, съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейските структурни и инвестиционни фондове.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен съвет на катедра Физиология на животните и човека, състоял се на 16.04.2018 г.

Научно жури:

Рецензенти:

Становища:

Защитата на дисертационния труд ще се състои на Г. от Ч.
в на Биологически факултет на
СУ „Св. Климент Охридски“, бул. Драган Цанков 8.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
УВОД	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
МАТЕРИАИ И МЕТОДИ.....	7
1. Използвани субстрати и ефектори.....	7
2. Подготовка на опитните животни	7
3. Подготовка на тъканите са изследване.....	9
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ	10
1. Определяне на субстратна специфичност на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в мъжки и женски полови незрели плъхове	10
2. Изследване влиянието на тестостерон върху активността на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза при мъжки полови незрели плъхове	11
3. Изследване влиянието на хидроксифлутамид върху активността на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в мъжки полови незрели плъхове.....	12
4. Изследване влиянието на дифлуорометилорнитин върху активността на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в мъжки полови незрели плъхове.....	13
5. Изследване влиянието на аминогуанидин върху активността на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в мъжки полови незрели плъхове.....	14
6. Изследване влиянието на ODQ върху активността на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в мъжки полови незрели плъхове.....	16
7. Изследване влиянието на синтазите на азотен оксид върху активността на чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в мъжки полови незрели плъхове.....	18
8. Изследване влиянието на въглеродни наночастици върху чернодробна и бъбречна диаминооксидаза в женски полови незрели плъхове.....	21
ОБСЪЖДАНЕ	22
1. Субстратна специфичност на диаминооксидазата.....	24
2. Тестостеронът като регулатор на диаминооксидазна активност	25
3. Влияние на хидроксифлутамид върху диаминооксидазна активност.....	25
4. Влияние на дифлуорометилорнитин върху диаминооксидазна активност.....	26
5. Влияние на аминогуанидин върху диаминооксидазна активност.....	27
6. Влияние на инхибитори на синтазите на азотен оксид върху диаминооксидазна активност	29
7. Влияние на комбинирано третиране с L-NAME и тестостерон върху диаминооксидазна активност	30
8. Влияние комбинирано третиране с L-NAME и аминогуанидин върху диаминооксидазна активност.....	30

9. Влияние на ODQ върху диаминооксидазна.....	31
10. Влияние на въглеродни наночастици върху диаминооксидазна активност.....	34
ИЗВОДИ	36
ПРИНОСИ	37
СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, ВКЛЮЧЕНИ В ДИСЕРТАЦИЯТА.....	38

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АГ	аминогуанидин
ДАО	диаминооксидаза
ДФМО	дифлуорометилорнитин
ОДК	орнитиндекарбоксилаза
ПА	полиамини
Пут	путресцин
Спд	спермидин
Спм	спермин
цГМФ	цикличен гуанозинмонофосфат
Cu-AO	мед-съдържащи аминоксидази
L-NAME	L ^ω -нитро-L-аргининметил-естер хидрохлорид
L-NMMA	L-N ^G -монометил аргинин цитрат
NOS	синтази на азотен оксид
n, e, iNOS	невронална, ендотелна, индуцируема NOS
ODQ	<i>1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one</i>
sGC	разтворима гуанилатциклаза

В работата са използвани три буквени съкращения на аминокиселини на латиница съгласно IUPAC.

У В О Д

Диаминоксидазата (ДАО) е катаболитен ензим от групата на Су-съдържащите аминоксидази, които участват в разграждането на някои биогенни амини. Тези ензими представляват особен интерес за учените, поради голямото разнообразие от субстрати които имат. Благодарение на което те са въввлечени в значими за организма метаболитни пътища при физиологични и патофизиологични състояния. Биогенните полиамини (ПА) се съдържат във всички живи клетки – прокариоти и еукариоти (гъби, растения и животни) и са изключително важни регулатори на клетъчния растеж, диференциацията в ембрионалното и индивидуално развитие, дори и на клетъчната смърт. Пълният набор от биологичните ефекти на полиамините не е напълно изяснен, но е известно, че те повлияват клетъчните процеси на всички нива от генната транскрипция до белтъчния синтез и изпълняват специфични функции в клетъчния цикъл. Също така участват в диференциацията на имунните клетки и в отговора на организма при възпалителни и алергични реакции. Строгото регулиране на свободното полиаминово съдържание е от съществено значение за нормалния растеж, развитие и физиология при бозайници. То се поддържа от интензитета на процесите на биосинтез, катаболизъм и транспорт, както и от активността на ензимите, катализиращи тези процеси.

Във функционално отношение ДАО катализира окислителното дезаминиране на първични аминок групи на полиамините, като предпочитани субстрати са путресцинът, хистаминът и кадаверинът. Модулирането на активността на ДАО разкрива възможности да разглеждаме този ензим като част от превенцията на организма от натрупване на путресцин и хистамин.

Въглеродните наночастици притежават уникални физико-химични свойства, благодарение на които те намират все по-широко и обещаващо приложение в сферата на биотехнологиите, на медицината, в екологията. Изследванията за токсичност на въглеродните наночастици са неизменна част от бъдещето им приложение в областта на медицината за ранна диагностика на множество проблеми, при насочената доставка на лекарства, за избирателно терптиране на тумурни клетки и др.

В настоящия дисертационен труд се изследва регулацията на активността на ДАО в черен дроб и бъбреци на мъжки полове незрели плъхове. Проучени са ефектите на регулаторни фактори като мъжкия полов хормон тестостерон и на NO. Влиянието на NO е изследвано чрез инхибиране на синтезиращите го ензими

– синтазите на NO (NOS), и чрез блокиране на основния му сигнален път, съответно L-NAME, L-NMMA и ODQ. Тестостероновият ефект е изследван в условия на блокирани андрогенни рецептори чрез нестероидния антиандроген хидроксифлутамид. Проследена е активността на ДАО в резултат от прилагането на инхибитора аминоксидин (АГ), като и в условия на блокиран синтез на ПА чрез инхибиране на ключовия биосинтезен ензим орнитиндекарбоксилазата (ОДК) от дифлуорометилорнитин (ДФМО). Изследвана е и субстратната специфичност на ДАО.

Мониторингът на ДАО активността е от голямо значение за проследяване на нефизиологична пролиферация на клетките, водеща до апоптоза или до неопластичен растеж, като и за предпазване от хистаминов нетолеранс на организма.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва субстратната специфичност на ензима ДАО и да се проследи регулаторното влияние на тестостерон, на аминоксидин, на синтазите на азотен оксид и на въглеродни наночастици върху неговата активност в черен дроб и бъбреци от полово незрели плъхове.

За постигане на тази цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се изследва активността на ДАО при различни субстрати в черен дроб и бъбреци на мъжки и женски полово незрели плъхове.
2. Да се изследва влиянието на тестостерон върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове.
3. Да се изследва ефекта от блокирането на андрогенните рецептори върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове при контролни условия и при съвместно третиране с тестостерон.
4. Да се изследва ефектът от инхибирането на ензима орнитиндекарбоксилаза върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в контролни условия и при съвместно третиране с тестостерон в мъжки полово незрели плъхове.
5. Да се изследва влиянието на инхибитора аминоксидин върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове.

6. Да се изследва влиянието на синтазите на азотен оксид върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове.

7. Да се изследва влиянието на вътреклетъчната сигнална верига на азотен оксид върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове.

8. Да се изследва влиянието на въглеродни наночастици върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в женски полово зрели плъхове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ИЗПОЛЗВАНИ СУБСТРАТИ И ЕФЕКТОРИ

Субстрати: спермидин, спермин, хистамин и пуресцин от Sigma, Aldrich (Германия);

Ефектори: аминогуанидин хемисулфад, дифлуорометилорнитин, хидроксифлутамид, L-N^G-монометил аргинин цитрат (L-NMMA), N^ω-нитро-L-аргининметил-естер хидрохлорид (L-NAME), [1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one] (ODQ) от Sigma, Aldrich (Германия), тестостерон пропионат от Fluka (Германия); Въглеродните наночастици бяха синтезирани и предоставени от на доц. Александър Луканов (Факултет по инженерни и природни науки, Университет Сайтама, Япония).

2. ПОДГОТОВКА НА ОПИТНИТЕ ЖИВОТНИ

В експериментите бяха използвани здрави плъхове порода Wistar – мъжки на възраст около 30-35 дни и женски 35-40 дневни. Телесното тегло на опитните животни беше 78.1 ± 9.4 g (n = 153).

В in vivo експериментите животните бяха третирани чрез интраперитонеално инжектиране на изследваните ефектори. Експерименталните животни от всяка серия бяха разделяни в две основни групи – контролна и опитна. В контролната група животните бяха третирани със съответния разтворител – физиологичен разтвор, пропиленгликол или DMSO. В опитната група животните бяха третирани съобразно данните от таб. 1:

Таблица 1. Серии експерименти, според използвания ефектор

приложен ефектор	доза на ефектора	разтворител
тестостерон	20 µg / животно	0.2 ml пропиленгликол
хидроксифлутамид	5 mg / животно	40 µl Диметил сулфоксид; до 0.2 ml с 0.9% NaCl, непосредствено преди третирането
дифлуорометилорнитин	с 2 mg / животно	0.2 ml 0.9% NaCl.
аминогуанидин	0.4 mg / на животно 1 mg / на животно 4 mg / на животно	0.2 ml 0.9% NaCl
ODQ	2 mg/kg т. м.	10 mg/ml Диметил сулфоксид; до 0.2 ml с 0.9% NaCl, непосредствено преди третирането
L-NAME	0.01 mg / животно 1 mg / животно	0.2 ml 0.9% NaCl
L-NMMA	0.9 mg / животно	0.2 ml 0.9% NaCl
въглеродните наночастици	4 mg / животно	0.2 ml 0.9 % NaCl

За проследяване на ефекта от съвместното действие на горепосочените ефектори и тестостерон (HF и тестостерон; ДФМО и тестостерон; АГ и тестостерон; ODQ и тестостерон; ODQ и АГ; L-NAME и тестостерон; L-NAME и АГ и L-NMMA и тестостерон) животните бяха инжектирани последователно със съответните ефектори. В комбинираните третираня АГ беше прилаган в доза 0.4 mg; L-NAME – 1mg, а останалите – в посочените по-горе дози.

За провеждането на всички *in vivo* опити експерименталните животни бяха инжектирани в сутрешните часове между 08.00 и 09.00 часа и декапитирани 4 часа по-късно.

Инжектирането и декапитирането на експерименталите животни се извършваше след предварително анестезиране с диетилов етер. След декапитиране изследваните органи бяха незабавно изолирани и отделяни на лед за приготвяне на хомогената.

В *in vitro* условия бяха проведени експериментите: 1. За определяне на субстратната специфичност на ДАО, като изследването се провеждаше по стандартната методика, но вместо субстрата путресцин (Пут) към реакционната среда бяха добавяни субстратите спермин (Спм), спермидин (Спд) или хистамин (Хис); 2. За изследване влиянието на въглеродните наночастици (165 µl/ml бидестилирана H₂O), те бяха добавяни към стандартната реакционна среда преди преинкубацията, както в контролните, така и в опитни проби.

3. ПОДГОТОВКА НА ТЪКАНИТЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

Изследваните органи бяха изолирани, подсушавани, претегляни и хомогенизирани в 0.01 М натриево-фосфатен буфер (pH 7.0) в съотношение 1:4 (тъкан:буфер). Полученият хомогенат беше нагряван на 60°C за 10 min на водна баня, след което центрофугиран при 20 000 g за 20 min. Получената супернатанта беше отделяна и използвана като източник на ензимна активност.

Определяне на активността на диаминооксидаза

ДАО активността беше определяна спектрофотометрично по метод, описан от Dimitrov и съавт. (1996), по количеството на H₂O₂, образуван в хода на аминоксидазната реакция, стандартно със субстрат Пут, при образуването на цветен комплекс с фенол и 4-аминоантипирин в присъствие на пероксидаза.

Стандартната реакционна среда съдържаше: 300 µl ензимен източник, 12 IU пероксидаза, 1 mM семикарбазид, 2.5 mM Пут, 0.82 mM 4-аминоантипирин, 10.6 mM фенол. Краен обем на реакционната среда – 3.0 ml. Реактивите бяха разтваряни в 0.1 М натриево-фосфатен буфер за реакционна среда с pH 7.4.

Контролните проби, съдържащи супернатанта, пероксидаза и семикарбазид, и опитните проби, съдържащи същите компоненти, с изключение на семикарбазид, бяха преинкубирани на водна баня при 37° C за 20 min. След изтичане на времето за преинкубация във всички проби (контролни и опитни) бяха добавяни останалите компоненти на реакционната среда – субстрат Пут, 4-аминоантипирин и фенол и инкубирани при 37° C за 60 min на водна баня. След което реакция беше прекратявана чрез поставяне на пробите на ледена баня за 2 min, и в опитните проби беше добавян семикарбазид. Екстинкцията на получения цветен комплекс в опитните проби беше измервана спектрофотометрично при дължина на вълната λ=500 nm срещу контролната проба.

Определяне количеството на белтъка в пробите

Съдържанието на белтъка в пробите беше определяно по метода на Lowry и съавт. (1951) с използването на говежди серумен албумин като стандарт. Използвани бяха следните реактиви: реактив А (2% Na₂CO₃ разтворен в 0.1 N NaOH), реактив В (0.5% CuSO₄.5H₂O разтворен в 1% натриев цитрат), реактив С (50 ml реактив А + 1 ml реактив В), приготвен непосредствено преди работа и 1 N реактив на Фолин.

Анализ и статистическа обработка на получените резултати

При анализиране на получените резултати активността на ДАО беше изразявана в $\text{nmol H}_2\text{O}_2/60\text{min/mg}$ белтък, като беше използван стандартен моларен коефициент – $5769 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Промяната на активността на ДАО (Δ [%]) беше изчислявана като разлика между контролните стойности и опитните стойности, резултат от действието на приложените ефектори, и беше нормализирана към контролните.

Статистическият анализ на получените резултати беше извършван със софтуер *SigmaStat* версия 3.5. Данните бяха представяни като средна стойност \pm стандартна грешка (SEM). За установяване на разликите между групите с различно третиране беше прилаган one-way ANOVA тест, последван от *Tukey* тест, като за статистически значима разлика беше приеман $p < 0.05$.

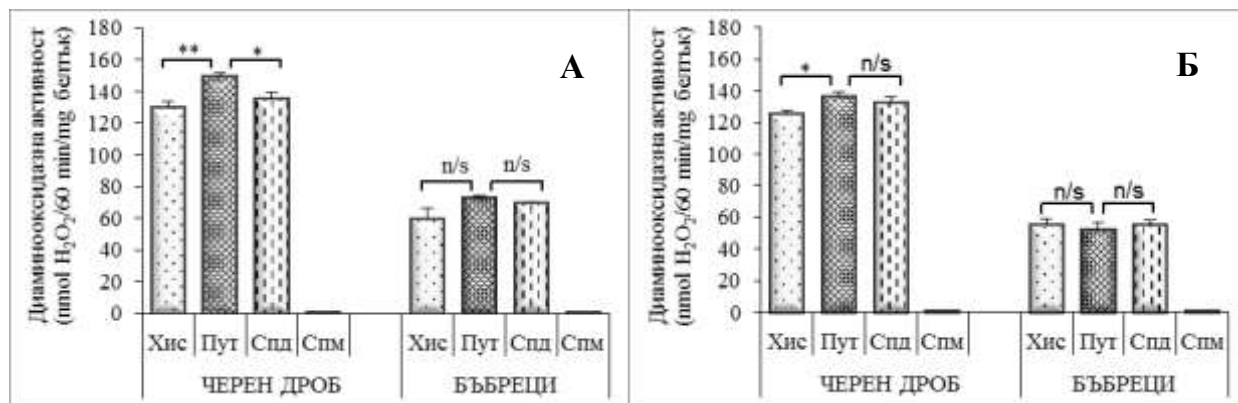
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУБСТРАТНА СПЕЦИФИЧНОСТ НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В МЪЖКИ И ЖЕНСКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

В първата серия опити беше определена активността на ДАО в присъствие на четири потенциални субстрата – моноамина хистамин, диамина путресцин и полиамините спермидин и спермин. Ензимната активност беше изследвана в черен дроб и бъбреци на мъжки и женски полово незрели плъхове.

Както се вижда от фиг. 1 в черен дроб на мъжките индивиди най-висока ензимна активност беше измерена със субстрат Пут ($148.9 \pm 2.88 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/60 \text{ min/mg}$ белтък, $n = 5$), следван от Спд ($135.3 \pm 3.87 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/60 \text{ min/mg}$ белтък, $n = 5$) и Хис ($129.7 \pm 4.28 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/60 \text{ min/mg}$ белтък, $n = 5$). Установена беше статистически достоверна разлика между средните стойности на активностите на ДАО при използването на субстрат Пут и Спд ($p < 0.05$) и Пут и Хис ($p < 0.01$). В бъбреци активността на ДАО показва подобна зависимост – най-висока активност беше измерена в присъствието на субстрат Пут ($72.25 \pm 1.69 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/60 \text{ min/mg}$ белтък, $n = 4$), по-ниска – със субстрат Спд ($69.4 \pm 1.0 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/60 \text{ min/mg}$ белтък, $n = 4$) и най-ниска – със субстрат Хис ($59.25 \pm 7.47 \text{ nmol H}_2\text{O}_2/60 \text{ min/mg}$ белтък, $n = 4$). В този орган разликата между средните стойности на ензимната

активност при субстрати Пут, Спд и Хис, изчислена спрямо най-високата активност, не показва статистически достоверна разлика.



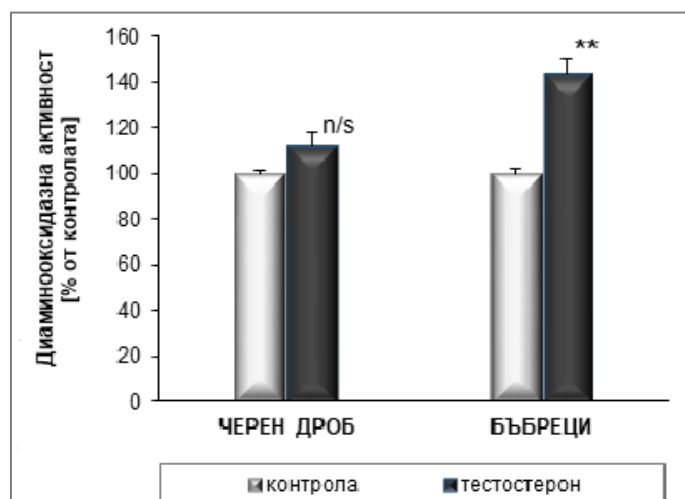
Фигура 1. Диаминооксидазна активност в черен дроб и бъбреци на мъжки (А) и женски (Б) полово незрели плъхове при субстрати хистамин (Хис), путресцин (Пут), спермидин (Спд) и спермин (Спм). Данните са представени като средна стойност \pm SEM от пет независими опита. * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ – значими разлики от активността на ензима със субстрат путресцин.

При женските животни резултатите показват сходни стойности за активността на ДАО с тези, които се наблюдават в черен дроб на мъжки плъхове. В черен дроб ензимът проявява относително най-висока активност със субстрат Пут (136.2 ± 3.24 nmol $H_2O_2/60$ min/mg белтък, $n = 4$), следван от Спд (132.1 ± 3.86 nmol $H_2O_2/60$ min/mg белтък, $n = 4$) и Хис (124.9 ± 2.80 nmol $H_2O_2/60$ min/mg белтък, $n = 4$). Статистически достоверна разлика между средните стойности на активностите е установена само между субстрати Пут и Хис ($p < 0.05$). Получените резултати за активността на ДАО в бъбреци показват почти еднакви стойности при различните субстрати: Пут (52.25 ± 4.26 nmol $H_2O_2/60$ min/mg белтък, $n = 4$), Спд (54.7 ± 3.60 nmol $H_2O_2/60$ min/mg белтък, $n = 4$), Хис (55.3 ± 3.41 nmol $H_2O_2/60$ min/mg белтък, $n = 4$).

Както при мъжките, така и женските животни ДАО активност при използването на субстрат Спм не беше измерена.

2. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ТЕСТОСТЕРОН ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА ПРИ МЪЖКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

Данните от фиг. 2 свидетелстват за статистически достоверен стимулиращ ефект на тестостерона върху активността на ДАО в бъбреци (44.01 ± 6.64 %, $P = 0.002$, $n = 6$). Докато в черен дроб отчетеното слабо нарастване на ензимната активност (12.72 ± 6.02 %, $P = 0.065$, $n = 6$), беше статистически недостоверно.



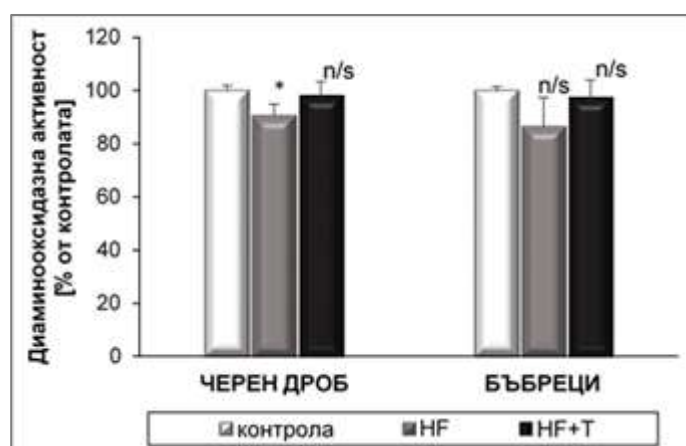
Фигура 2. Влияние на тестостерон върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полово незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от шест независими опита. $** p < 0,01$ – значими разлики от контролната група.

Изложените резултати подкрепят литературните данни, както и тези, получени при предходни изследвания в нашата лабораторията относно влиянието на половите стероиди върху активността на ДАО (Димитров, 2000; Pavlov, 2000). Повишената активност на ДАО вероятно е резултат от стимулираната експресия на ензима, което е в съответствие с основния механизъм на действие на стероидните хормони.

3. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ХИДРОКСИФЛУТАМИД ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В МЪЖКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

Известно е, че тестостеронът осъществява ефектите си чрез свързване с андрогенни рецептори. За да установим дали тестостерон-стимулираното повишаване на ДАО активността макар и слабо в черен дроб и по-силно в бъбреци се реализира по този механизъм. В следващата група експерименти ние предприехме блокиране на тези рецептори чрез известен андроген-рецепторен антагонист – хидроксифлутамид. Влиянието му върху активността на ДАО е представено на фиг. 3. Регистрирано беше понижение на ензимната активност – статистически достоверно в черен дроб (-9.54 ± 4.39 %, $P = 0.025$, $n = 4$) и недостоверно в бъбреци (-13.7 ± 10.99 %, $P = 1.00$, $n = 4$), сравнено с нетретирани контролни животни. Тези промени в активността на ДАО в черен дроб бяха минимизирани в присъствието на тестостерон и активността на ДАО беше

съизмерима с тази при контролите: при черен дроб $-2.00 \pm 5.36\%$, $n = 8$; при бъбреци $-2.85 \pm 6.81 \%$, $P = 0.442$, $n = 8$. Ефектите от комбинираното третиране, съпоставени с тестостерон-индуцираните промени в ензимната активност, показват незначимо понижаване в черен дроб с $-13.06 \pm 4.76 \%$ ($P = 0.07$) и значимо понижаване в бъбреците с $-30.99 \pm 4.84 \%$ ($P \leq 0.001$). Резултатите от тази серия експерименти предполагат наличието на механизъм на регулация на ДАО от тестостерона, който е зависим от взаимодействието на тестостерона с андрогенния рецептор. Блокирането на андрогенния рецептор в условия на екзогенно добавен тестостерон от една страна възпрепятства ефекта на самостоятелно въведения хормон, сравнено с контролата, а от друга страна тестостеронът в много слаба степен, недостовърно повишава ДАО активност, сравнено с ефекта на самостоятелно въведения хидроксифлутамид.

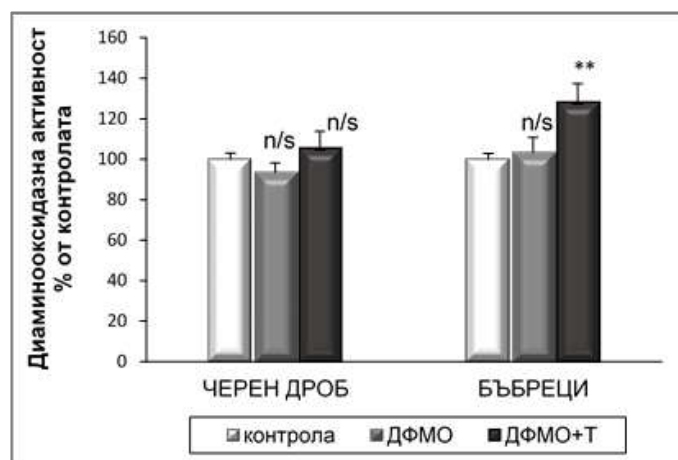


Фигура 3. Влияние на хидроксифлутамид (HF) (5 mg на животно) върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полове незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от четири (HF) и осем (HF+T) независими опита. * $p < 0.05$ – значими разлики от контролната група.

4. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ДИФЛУОРОМЕТИЛОРНИТИН ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В МЪЖКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

Тестостеронът участва и в регулацията на ОДК като повишава нейната активност (Svechnikov et al., 2000). Беше изследвана ролята на промяната в метаболизма на ПА към повишената ДАО активност в присъствие на тестостерон чрез третиране с ДФМО – самостоятелно и в комбинация с тестостерон. В резултат от инхибирането на ОДК бяха регистрирани незначими изменения в активността на ДАО и в двата изследвани органа. В черния дроб беше установено понижаване с

$-6.54 \pm 14.14 \%$ ($P = 0.343$, $n = 4$), в бъбреците – повишаване с $3.32 \pm 7.42 \%$ ($P = 0.343$, $n = 4$) сравнено с контролната активност.



Фигура 4. Влияние на дифлуорометилорнитин (ДФМО) (5 mg на животно) самостоятелно и в комбинация с тестостерон върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полово незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от четири (ДФМО) и осем (ДФМО+Т) независими опита. $**p < 0.01$ – значими разлики от контролната група

Едновременното инжектиране на ДФМО и тестостерон в бъбреците предизвика статистически значимо повишаване на ензимната активност ($28.24 \pm 8.97 \%$, $P = 0.009$, $n = 8$), което бе съизмеримо с ефекта на приложен самостоятелно тестостерон. В черният дроб беше регистрирано недостоверно повишаване на ензимната активност ($5.47 \pm 8.24 \%$, $P = 0.105$, $n = 8$) сравнено с контролата (фиг.4).

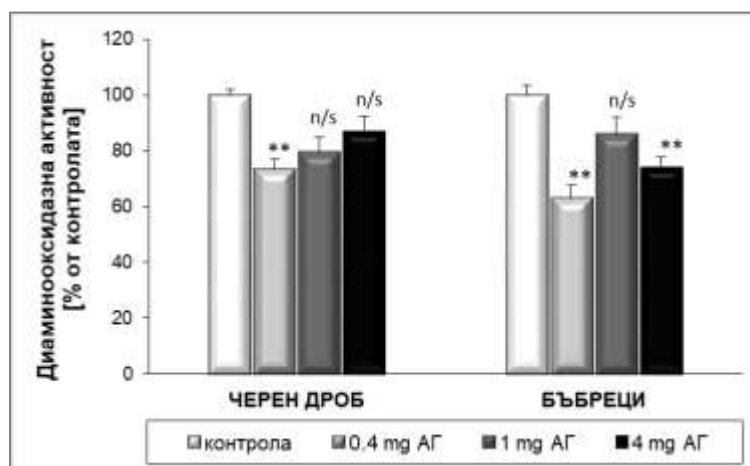
Тези резултати показват, че инхибирането на ОДК не оказва влияние върху активността на ДАО в избрания от нас експериментален модел.

5. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА АМИНОГУАНИДИН ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В МЪЖКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

Изследването на инхибиторните свойства на АГ върху ДАО активност беше проведено с три различни дози АГ – 0.4 mg, 1 mg и 4 mg на животно. В тази група опити влиянието на аминогуанидина върху ензимната активност беше проследено самостоятелно и в комбинация с тестостерон.

Влияние на самостоятелно въведен аминоксидин върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки половозрели плъхове.

Ефектът на аминоксидина върху активността на ДАО беше проявен в различна степен в двата изследвани органи (фиг. 5). В резултат от третирането на животните с най-ниската доза 0.4 mg АГ беше регистриран статистически достоверен инхибиторен ефект върху активността на ДАО и в двата изследвани органа: в черен дроб с $-26.77 \pm 3.57\%$ ($P = 0.009$, $n = 7$), в бъбреци с $-36.94 \pm 4.75\%$ ($P = 0.001$, $n = 6$). Въвеждането на по-високата доза – 1 mg АГ не доведе до значими промени на ензимната активност, както в черен дроб ($-20.67 \pm 5.56\%$, $P = 0.151$, $n = 5$), така и в бъбреци ($-13.94 \pm 5.78\%$, $P = 0.273$, $n = 8$). Най-високата приложена доза 4 mg АГ предизвиква статистически незначимо понижаване на активността на ДАО в черен дроб с $-13.33 \pm 5.57\%$ ($P = 0.105$, $n = 7$). Докато в бъбреци регистрираното понижаване на ензимната активност беше достоверно ($-26.01 \pm 3.68\%$, $P = 0.008$, $n=6$).

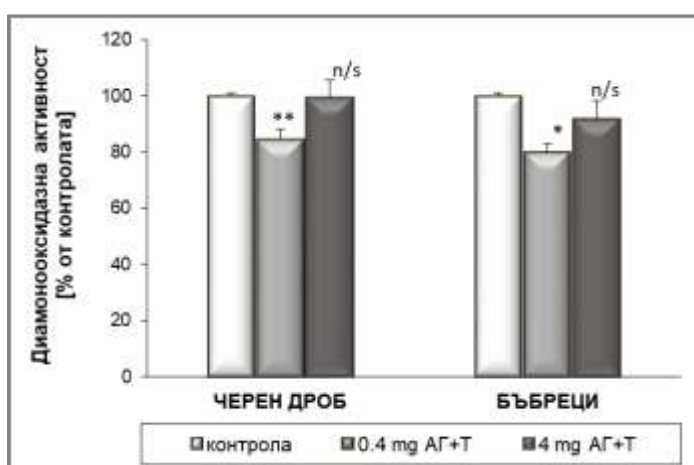


Фигура 5. Влияние на аминоксидин (АГ) в дози 0.4 mg, 1 mg и 4 mg върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от пет, шест и осем независими опита. ** $p < 0,01$ – значими разлики от контролната група.

Влияние на комбинираното третиране с аминоксидин и тестостерон върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки половозрели плъхове.

Ефектът на АГ изследваме и в ситуация на тестостеронова стимулация вследствие на комбинирано третиране. АГ беше прилаган в дози 0.4 mg и 4 mg. От представените на фиг. 6 резултати се вижда, че и в присъствие на тестостерон, АГ в доза 0.4 mg проявява инхибиторен ефект и значимо понижава активността на

ДАО, като в черен дроб ($-15.44 \pm 3.61 \%$, $P = 0.007$, $n = 7$), така и в бъбреци ($-20.04 \pm 3.16 \%$, $P = 0.026$, $n = 7$). Този инхибиторен ефект, съпоставен с инхибиторния ефект от самостоятелното действие на 0.4 mg АГ (фиг. 5), е проявен в по-слаба степен и в двата изследвани органа. Анализът на данните от комбинираното инжектиране на високата доза АГ и тестостерон показват минимизиране на инхибиторното действие на АГ от тестостерона, при това без тестостеронът да води до активиращо действие, надвишаващо достоверно контролните стойности на ДАО. Така регистрираната ензимна активност в черен дроб е понижена с $-0.60 \pm 6.08 \%$ ($P = 0.710$, $n = 7$), а в бъбреци – с $-8.35 \pm 6.59 \%$ ($P = 0.209$, $n = 7$).



Фигура 6. Влияние на аминоксидин в комбинация с тестостерон (АГ+Т) върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки плъхове. Аминоксидинът е приложен в дози 0.4 mg и 4 mg . Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от седем независими опита. ** $p < 0.01$ и * $p < 0.05$ – значими разлики от контролната група.

6. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ODQ ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В МЪЖКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

В следващата група експерименти беше изследвано участието на NO в регулацията на активността на ДАО чрез блокиране на разтворимата гуанилатциклаза (sGC), която е ключов ензим от неговата вътреклетъчната сигнална верига $\text{NOS} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow$ цикличен гуанозинмонофосфат (цГМФ). NO реализира многобройните си физиологични ефекти основно с участието на вторичния посредник цГМФ, продуциран от ензима sGC. Третирането на

животните със селективения и необратим инхибитор ODQ на sGC ни позволи да разкрием нейната ролята в регулацията на ДАО.

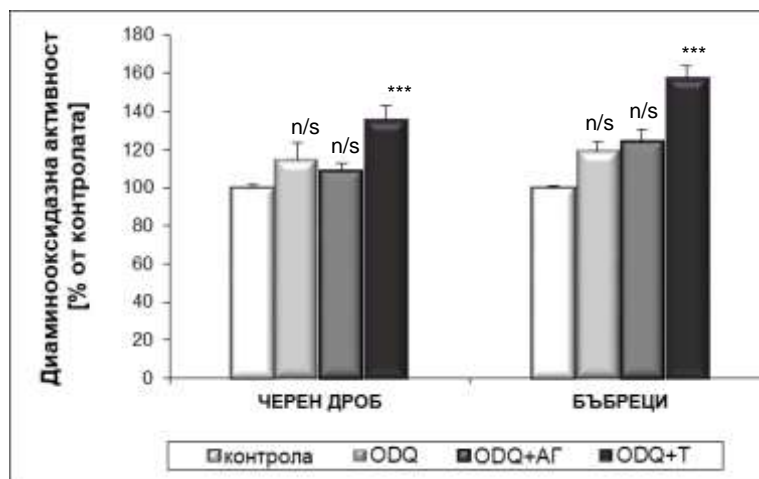
Самостоятелно въведен ODQ индуцира статистически недостоверно повишаване на ензимната активност на ДАО, както в черен дроб ($14.85 \pm 8.9 \%$, $P = 0.310$, $n = 6$), така и в бъбреци ($19.19 \pm 4.58 \%$, $P = 0.467$, $n = 6$) (фиг.7).

В резултат от комбинирано приложението ODQ и АГ (фиг. 7), вторият като инхибитор на ДАО и NOS в доза 0.4 mg, не беше регистрирана статистически достоверна промяна в активността на ДАО и в двата изследвани органа, сравнено с контролната активност, въпреки значимото инхибиторно действие на самостоятелно въведения АГ (в доза 0.4 mg).

При черен дроб беше отчетено слабо повишаване на ензимната активност с $8.34 \pm 4.58 \%$ ($P = 0.151$, $n = 5$) спрямо контролата и понижаване с $-9.74 \pm 2.82 \%$ ($P = 0.456$) спрямо ODQ-ефекта. В бъбреци едновременното въвеждане на ODQ и АГ повиши недостоверно активността на ДАО с $23.8 \pm 6.71 \%$ ($P = 0.690$, $n = 6$) в сравнение с контролата и с $14.07 \pm 5.49 \%$ ($P = 0.407$) в сравнение с ODQ-ефект.

Тези данни подкрепят хипотезата, че в контролни условия чернодробната и бъбречна NOS чрез NO подкрепят активността на ДАО по механизъм различен от основния сигналния път на NO водещ до продуцирането на цГМФ от sGC.

В друга група експерименти на животните беше приложено комбинирано третиране с ODQ и тестостерон. Получените резултати свидетелстват за значително, статистически достоверно повишаване на активността на ДАО: в бъбреци с $57.60 \pm 6.40 \%$ ($P \leq 0.001$, $n = 8$), в черен дроб с $35.57 \pm 7.46 \%$ ($P \leq 0.001$, $n = 8$). Тези ефекти са съизмерими и дори надвишават тестостерон-индуцираното активиране на ДАО (фиг.7).

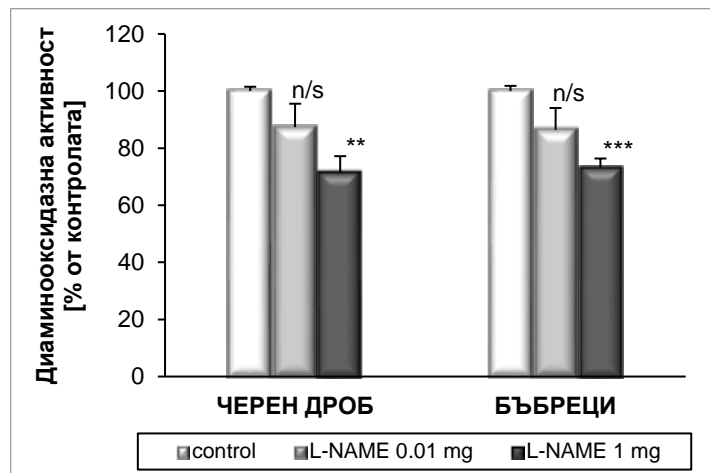


Фигура 7. Влияние на самостоятелно въведен ODQ (2 mg/kg), в комбинация с аминоксантидин (0.4 mg) (ODQ+АГ) и в комбинация с тестостерон (20 µg) (ODQ+Т) върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полово незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност ± SEM от пет и шест независими опита. *** p < 0.001 – значими разлики от контролната група.

7. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА СИНТАЗИ НА АЗОТЕН ОКСИД ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В МЪЖКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

Влияние на инхибитора L-NAME върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове.

За установяване ролята на NOS в регулацията на активността на ДАО при черен дроб и бъбреци беше използван селективният инхибитор на NOS – L-NAME в дози 0.01 mg и 1 mg на животно (фиг. 8). При третирането на животните с ниската доза L-NAME, беше регистрирано статистически незначимо понижаване на ензимната активност, както в черен дроб ($-12.64 \pm 8.19\%$, $P = 0.200$, $n = 6$), така и в бъбреци ($-13.57 \pm 7.64\%$, $P = 0.242$, $n = 6$). Докато въвеждането на високата доза L-NAME (1 mg) доведе до статистически значимо инхибиране на ДАО, като в черен дроб то е с $-28.48 \pm 5.61\%$ ($P = 0.002$, $n = 6$), а в бъбреци – с $-28.50 \pm 3.43\%$ ($P = 0.0009$, $n = 6$). Получените данни предполагат наличието на механизъм за регулация на активността на ДАО от синтазите на NO.

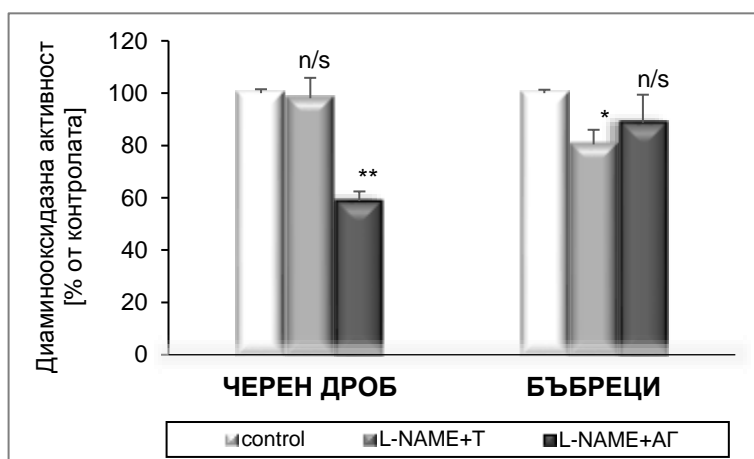


Фигура 8. Влияние на L-NAME в дози 0.01 mg и 1 mg върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полово незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от шест независими опита. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ – значими разлики от контролната група.

Влияние на инхибитора L-NAME в комбинация с тестостерон и аминоксидан върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полово незрели плъхове.

На фиг. 9 са представени резултатите от експериментите, проведени при третиране с L-NAME (1 mg) в комбинация с тестостерон. Едновременно приложените L-NAME и тестостерон показаха ясно изразена тъканна специфичност. В черния дроб L-NAME-индуцираното понижаване на активността на ДАО беше дискриминирано в присъствието на тестостерон, като активността на ДАО бе съизмерима с контролата ($-1.94 \pm 7.81\%$, $P = 0.671$, $n=9$). От друга страна, комбинираното третиране L-NAME и тестостерон, сравнено със самостоятелното действие на L-NAME, показва значимо повишаване на активността на ДАО с $37.11 \pm 10.92\%$, ($P = 0.012$). В бъбреците инхибиторният ефект на L-NAME се запази в присъствието на тестостерон ($-21.39 \pm 5.6\%$, $P = 0.010$, $n=8$). При сравнение на инхибиторното действие на L-NAME – самостоятелно приложен и в комбинация с тестостерон се вижда, че разликата в активностите на ДАО не е статистически достоверна ($9.92 \pm 6.68\%$, $P = 0.306$).

Едновременното въздействие на двата инхибитора на NOS – L-NAME и АГ върху активността на ДАО показва статистически достоверно задълбочаване на инхибиторния ефект в черен дроб ($-41.26 \pm 3.69\%$, $P = 0.008$, $n = 5$), за разлика от бъбреците, където бе отчетено недостоверно понижаване на ензимната активност с $-11.32 \pm 10.75\%$, ($P = 1.00$, $n = 6$) (фиг. 9).

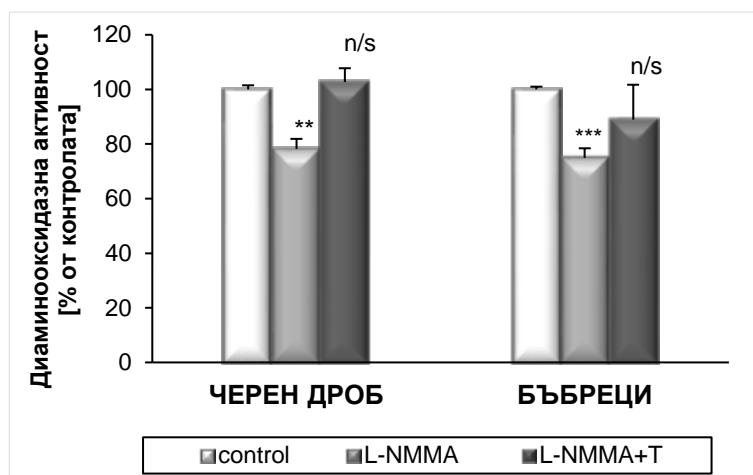


Фигура 9. Влияние на L-NAME в комбинация с тестостерон (L-NAME+T) и аминоксиданогин (L-NAME+AG) върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полови незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от осем и девет (L-NAME+T) пет и шест (L-NAME+AG) независими опита. $** p < 0.01$ – значими разлики от контролната група.

Влияние на инхибитора L-NMMA самостоятелно и в комбинация с тестостерон върху активността на чернодробна и бъбречна ДАО в мъжки полови незрели плъхове.

Вторият използван неселективен инхибитор на NOS – L-NMMA предизвика ефекти подобни на тези на L-NAME. Самостоятелното третиране с L-NMMA понижи статистически достоверно активността на чернодробната с $-21.89 \pm 3.69 \%$, ($P = 0.008$, $n = 5$) и бъбречната с $-25.14 \pm 3.57 \%$ ($P = 0.0009$, $n = 8$) ДАО активност, сравнено с контролните стойности (фиг. 10).

В присъствието на тестостерон, инхибиторният ефект на L-NMMA беше елиминиран и активността на ДАО беше възстановена до контролна стойност в черния дроб ($-8.91 \pm 5.04 \%$, $P = 0.241$, $n = 5$). В бъбреците в резултат от едновременното инжектиране на L-NMMA и тестостерон беше отчетено статистическо недостоверно понижаване с $-11.08 \pm 12.80 \%$ ($P = 0.151$, $n = 5$) на активността на ДАО, сравнено с контролата (фиг. 10).



Фигура 10. Влияние на L-NMMA (0.9 mg) самостоятелно и в комбинация с тестостерон (20µg на животно) (L-NMMA+T) върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полово незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност ± SEM от пет независими опита. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ – значими разлики от контролната група.

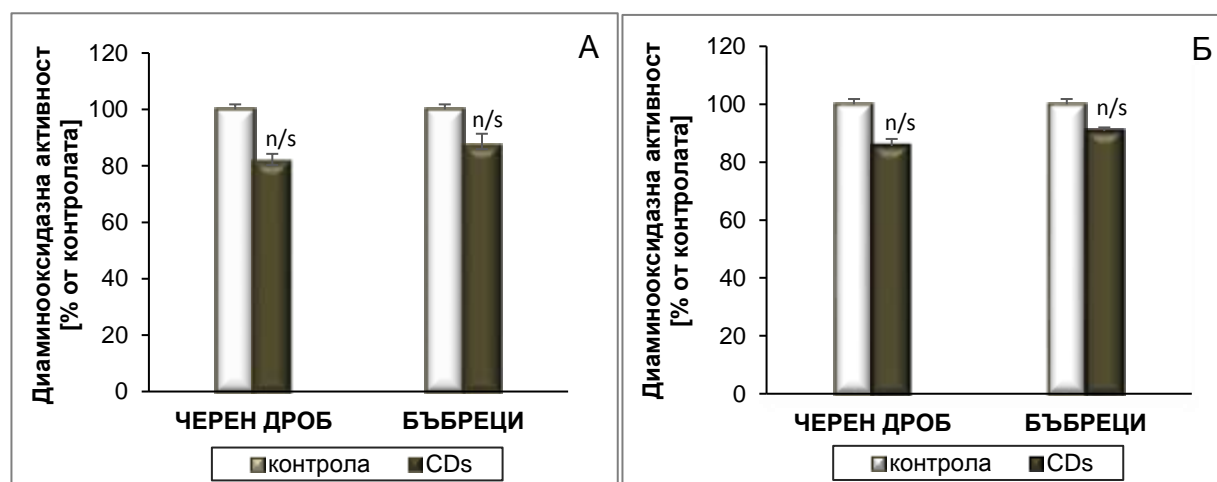
Резултатите с L-NAME предполагат частично зависимо от NOS действие на T.

8. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ВЪГЛЕРОДНИ НАНОЧАСТИЦИ ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА ЧЕРНОДРОБНА И БЪБРЕЧНА ДИАМИНООКСИДАЗА В ЖЕНСКИ ПОЛОВО НЕЗРЕЛИ ПЛЪХОВЕ

Въпреки многобройните публикации, съобщаващи за бъдещите био-приложения на въглеродните наночастици, все още липсват достатъчно данни относно тяхната токсичност. Ние изследвахме влиянието на тези наночастици върху активността на ДАО като ключов ензим за катаболизма на полиамините, които са изключително важни за клетъчната пролиферация и диференциация в норма и патология. Изследването беше проведено с женски полово незрели плъхове в *in vivo* и *in vitro* експерименти.

В приложените дози от 4 mg на животно (*in vivo*) и 165 µl/ml реакционна среда (*in vitro*) въглеродните наночастици предизвикаха статистически недостоверна промяна на активността на ДАО в черен дроб и бъбреци. В *in vitro* условия (фиг. 11 А) регистрираната промяна е както следва: в черен дроб – понижение с -18.74 ± 2.99 % ($P = 0.116$, $n = 7$), в бъбреци – с -13.08 ± 4.46 % ($P =$

0.503, n = 7). В *in vivo* условия (фиг. 11 Б) в черен дроб – промяна с $14.42 \pm 2.43 \%$ (P = 0.216, n = 7), в бъбреци – с $-9.72 \pm 1.27 \%$ (P = 0.590, n = 7).



Фигура 11. Влияние на въглеродни наночастици (CDs) в *in vitro* (А) and *in vivo* (Б) експерименти върху ДАО активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полове незрели плъхове. Активността на ензима е изчислена като процент от контролата. Данните са представени като средна стойност \pm SEM от седем независими опита.

Получените резултати от изчисления от нас експериментален модел не предполагат токсичен ефект. Токсичността на наночастиците е все още в процес на установяване на стандарти и подходи за нейното определяне и затова изборът на тези два важни хомеостатични органи е оправдано и актуално предвид тяхното потенциално влияние върху целия организъм.

ОБСЪЖДАНЕ

Както беше отбелязано в литературния преглед, ПА са абсолютно необходими за нормалния и патологичния растеж на всички тъкани, в подготовката на клетката за делене, за самото клетъчното делене, както и за клетъчната диференциация (Wallace et al., 2003; Casero et al., 2007). Освен това те се използват успешно като диагностични маркери при различни заболявания (Park & Igarashi, 2013), а също и в превенцията срещу заболявания, свързани с напредване на възрастта и с увеличаване продължителността на живот (Soda, 2015). ПА участват във формирането на нативната структура на ДНК и РНК, стабилизират клетъчната мембранна система (Schuber, 1989), модулират

неврофизиологични функции (Williams et al., 1991; Williams, 1997), участват в програмираната клетъчна смърт и регулацията на клетъчния цикъл (Purtonnet et al., 2000; Thomas & Thomas, 2001). Физиологичният ефект на ПА върху процесите на растеж, пролиферация и диференциация на клетките, тъканите и органите зависи от тяхната оптимална концентрация, която прецизно се регулира чрез баланса на процесите на биосинтез, разграждане и транспорт (Pegg, 2016). Ензимите от биосинтезния и катаболитните пътища на ПА са обект на постоянни изследвания с цел поддържане на нивата на вътреклетъчните ПА във физиологични граници (Miller-Fleming et al., 2015). Различни ендогенни субстанции – хормони (Svechnikov et al., 2000; Levillain et al., 2003), фактори на възпалението (Babbar et al., 2007), хепарин (Klocker et al., 2004), агматин (Coleman et al., 2004) и медикаменти, оказват влияние върху тези ключови ензимни активности. Степента на влияние на даден хормон в прицелните клетки и органи зависи основно от набора налични рецепторни молекули. Ефектите, предизвиквани от стероидните хормони, се проявяват в различна степен в хормон-зависимите и хормон-чувствителните тъкани. Полови хормони като тестостерон и естрогени оказват модулиращ ефект както върху активността на ОДК и ДАО, т.е. върху скоростта на синтеза и разграждане на ПА в изследваните органи (Jotova et al., 2000; Svechnikov et al., 2000), така също повлияват активностите на различните NOS (Chamness et al., 1995; Hodgin et al., 2002; Yu et al., 2010). Продуцираният NO от NOS е важна и универсална сигнална молекула, която участва в много физиологични и патологични процеси в организма (Alderton et al., 2001; Cals-Grierson & Ormerod, 2004; Mount & Power, 2006; Daff, 2010). Влиянието на NO върху ДАО – ензим, разграждащ ПА, бе изследвано чрез селективно инхибиране на синтезиращите NO синтази от една страна и чрез блокиране на основния вътреклетъчен сигнален път на NO от друга. Получените резултати за влиянието на инхибиторите на NOS върху активността на ДАО убедително подкрепят предположението, че NO е важен регулатор на ключовите за клетъчния растеж и диференциация ПА. Разкритата NO-зависима регулация на ДАО и оттам и възможностите за модулиране на вътреклетъчните ПА нива предполага сериозен терапевтичен потенциал на инхибиторите на NOS при различни патологични състояния, свързани с обмяната на ПА. Освен това метаболитните пътища на ПА и на NO са свързани на различни нива. На първо място те имат общ прекурсор – аминокиселината L-Agr, от която наред с NO се образува друга сигнална молекула – агматин, участваща в регулацията на метаболитните пътища както на ПА, така и на NO (Piletz et al., 2013). От друга страна ДАО катаболизира и агматина до друг

активен регулатор – агматиналдеhid. Агматинът има структура подобна на АГ. За АГ е известно, че е хидразиново съединение с инхибиторно действие върху ДАО (Šebela & Lawrence, 2009) и iNOS. Освен това ДАО разгражда агматина до агматиналдеhid, който от своя страна инхибира iNOS (Piletz et al., 2013). Агматинът навлиза в клетката като използва транспортните системи за полиамини, които имат ограничен капацитет и способност да се насищат при високи концентрации на биогенни амини в извънклетъчното пространство. Агматинът и ПА се конкурират за тези преносители, в резултат на което в клетката може да се получи недостиг на ПА и в това да се прояви част от антипролиферативните ефекти на агматина (Satriano et al., 2001a). Когато е блокиран биосинтезния път за ПА чрез ДФМО, в клетките компенсаторно се повишава импорта на ПА.

1. Субстратна специфичност на диаминооксидазата

Както беше посочено в литературния обзор единият от видовете Су-съдържащи аминоксидази е разтворимата ДАО, която катализира окислителното дезаминиране на първични аминогрупи на полиамините. В настоящето изследване е проследена субстратната специфичност на ДАО в черен дроб и бъбреци на мъжки и женски полово незрели плъхове. Регистрираните активности при използваните хистамин, путресцин, спермидин и спермин показват по-високи стойности в черния дроб и бъбреците при мъжките, отколкото при женските полово незрели плъхове. При различни бозайници – прасе, кон, куче, котка, включително човек, бъбречната ДАО се отличава със сравнително висока активност, докато активността при гризачи е по-слабо изразена (Stark, 2013). Получените от нас резултати за активността на ДАО в изследваните органи са в съответствие със съществуващите литературни данни (Seiler, 2004). Предпочитан субстрат на ДАО и съответно най-висока ензимна активност беше измерена с Пут в черен дроб и при двата пола. Така ензимът индиректно регулира нивата на Спд и Спм, тъй като ДАО разгражда Пут до продукти, които не могат да бъдат включени отново в биосинтезния път на ПА (Seiler et al., 1985). Според литературната справка ДАО проявява слаба активност към тетраамина спермин (Seiler, 2004). Активността на ДАО при субстрат спермидин е съизмерима с тази при Пут. Тези резултати ни дават основание да използваме в следващите експерименти Пут като най-подходящ субстрат за изследване на ДАО активност.

2. Тестостеронът като регулатор на диаминооксидазна активност

Черният дроб и бъбреците са хормон-чувствителни органи по отношение на половите хормони, т.е. тези хормони могат да модулират отделни метаболитни звена в клетките им, но не са абсолютно необходими за тяхното развитие и функциониране. Известно е, че половите хормони андрогени и естрогени оказват стимулиращ ефект върху активностите на ОДК и ДАО в изследваните органи в мишки (Jotova et al., 2000; Svechnikov et al., 2000; Maintz et al., 2006). При нашия експериментален модел тестостеронът в бъбреците оказва по-силен активиращ ефект върху активността на ДАО в сравнение с влиянието му в черен дроб. Вероятните причини за тази наблюдавана тъканна специфичност на тестостерона са няколко:

1) При бъбреци, в сравнение с черен дроб, се наблюдава по-ниска 5 α -редуктазна активност и следователно по-малка част от циркулиращият тестостерон се превръща в дихидротестостерон (Bullock & Vardin, 1973). Това се предполага от факта, че най-мощни анаболни ефекти проявява тестостерона. От своя страна дихидротестостерона се отличава с по-висок афинитет към андрогенните рецептори, отколкото тестостерон (Askew et al., 2007);

2) В бъбреци, андрогенната стимулация води до удължаване на полуживота и повишаване на активността на ензимите от биосинтезния път на ПА – ОДК и аденозилметиониндекарбоксилаза. Това предполага косвено повишаване на ДАО, което се потвърждава от данни, получени от други изследователски групи, в резултат от третиране с тестостерон (Satriano, 2006);

3) В черен дроб, мастна тъкана и мозък под действието на ензима ароматаза малък процент от циркулиращият тестостерон се превръща в естрадиол, което редуцира тестостероновото количество (Gooren & Toogians, 2003).

Съвкупността от всички тези влияния може да доведе до регистрираната от нас по-висока активност на ДАО в бъбреците.

3. Влияние на хидроксифлутамид върху диаминооксидазна активност

Известно е, че основният механизъм по който тестостеронът реализира ефектите си в организма е посредством свързване с андрогенните рецептори. Те се експресират в прицелни за тестостерона клетки като простата, скелетни мускули, черен дроб, централна нервна система, бъбреци и могат да свързват както тестостерон, така и дихидротестостерон за реализиране на техните биологични

ефекти в организма (Gao et al., 2005). В медицинската практика блокирането на андрогенния рецептор посредством хидроксифлутамид представлява успешен метод за възпрепятстване на анаболните ефекти на андрогените при редица заболявания – рак на простатата и други тумори (Shang et al., 2015), като за терапевтични цели се предпочитат ниските дози от този антиандрогенен фактор (Zuo et al., 2002).

Прилагането на хидроксифлутамид в настоящите изследвания имаше за цел да внесе повече яснота за механизма на регулация на ДАО от тестостерон. Резултатите за ефекта на интраперитонеално въведения хидроксифлутамид върху активността на ДАО в черен дроб и бъбреци, потвърждават литературните данни за блокиращия ефект на антиандрогена, в резултат на което биологичните ефекти на тестостерона не се реализират (Gao et al., 2004; Yu et al., 2010). Приложен в ниски дози антиандрогенът блокира частично андрогенните рецептори, което вероятно е причина за слабия активиращ ефект на тестостерона върху ДАО при комбинираното третиране, в сравнение с ефекта на хидроксифлутамида, приложен самостоятелно. В същото време активността на ДАО, регистрирана в условия на конкурентно третиране с хидроксифлутамид и тестостерон, е съизмерима с тази при контролни условия.

4. Влияние на дифлуорометилорнитин върху диаминооксидазна активност

Известно е, че тестостеронът притежава мощен анаболен потенциал, има данни, че повлиява и синтеза на ПА, като стимулира ОДК, първият ензим от синтетичният път (Каруаћо et al., 1984). Неговата активност е ключова за осигуряване на физиологичните нива на ПА в клетките. Тя може да се повиши в отговор на растежни фактори, онкогени, от ниски нива на ПА (Pegg, 2006), от хормони като инсулин, пролактин, глюкокортикоиди, соматотропен и от полови хормони (Qin et al., 2004; Uemoto et al., 2011). За цитостатичен ефект върху стимулираните към растеж клетки при патологични състояния се прилагат инхибитори на ОДК, какъвто е и ДФМО (Marton & Pegg, 1995).

За да проверим дали регистрираната тестостерон-стимулирана ДАО активност е резултат от ефекта на тестостерона конкретно върху ДАО или представлява сумарен ефект от действието му върху ОДК и върху ДАО използвахме ДФМО. Получените от нас данни свидетелстват за отсъствието на

ефект наДФМО върху активността на ДАО в изследваните органи от плъх. Необходимо е да отчетем факта, че в условия на блокиран синтез за ПА, клетката може по компенсаторен механизъм да си набави необходимите ПА – чрез повишаване на транспорта им в цитозола (Satriano, 2001a). Това е възможна причина за отчетената непроменена ДАО активност.

Първоначалното предположение за участие на механизъм за субстратно регулиране на ДАО, при което понижените вътреклетъчни нива на ПА в резултат на инхибирането на ОДК, водят до по-ниски активности на ДАО в черен дроб и бъбреци се нуждае от допълнителни изследвания за своето изясняване.

От друга страна в резултат от комбинираното третиране наДФМО с тестостерон беше отчетено слабо повишаване на ДАО активност, по-силно изразено в бъбреци, сравнено със самостоятелния ефект наДФМО. Не е изключеноДФМО да проявява селективен инхибиторен ефект по отношение на тъканта, експресираща ОДК. Подобни на тези резултати са получени при изследване на съвместното действие на тестостерона иДФМО в мускули и простата (Jasuja et al., 2014). Друга вероятна причина за повишената активност на ДАО в бъбреци в условия на комбинирано третиране (ДФМО и тестостерон) е възможността тестостерона да активира ензима спермидин/спермин ацилтрансфераза от катаболитното взаимопревръщане на ПА, с което да се възстановяват нивата на Пут, а активността на ДАО да остане непроменена, въпреки инхибирането на ОДК (Levillain et al., 2003). И не на последно място причината за макар и слабото повишаване на ензимната активност е именно влияние на тестостерона конкретно върху активността на ДАО.

5. Влияние на аминокуанидин върху диаминооксидазна активност

Ефектът на АГ върху ДАО в настоящото изследване потвърждава резултати, получените от други изследователи (Rokkas et al., 1990; Šebela & Lowrence, 2009). В тестваните концентрации АГ потиска дозозависимо активността на ДАО в черен дроб и бъбреци на полово незрели плъхове. Най-вероятно този ефект се дължи на свързване на инхибитора с каталитичния център на ДАО, съгласно известен механизъм (High, 1999; Šebela & Lowrence, 2009). Възможно е също АГ да се свързва с отрицателно заредения субстрат или със субстрат-свързващото място в ензимната молекула (Nilsson, 1999), като по този начин АГ да се конкурира с Пут, а това да води до повишаване нивото на ПА в клетките, което е сигнал за синтез на

нови ензимни молекули. Така новосинтезираната ДАО може да компенсира частично инхибиторния ефект на АГ.

Получените резултати показват, че ензимът е най-чувствителен към най-ниската приложена доза АГ от 0.4 mg/животно в двата изследвани органа, която се доближава до най-често използваната *in vivo* концентрация на АГ (Nilsson, 1999). Това ни дава основание да предположим, че високите концентрации АГ отключват компенсаторни механизми, свързани с поддържане на физиологични нива на ПА в клетките, или имат някакви други неспецифични ефекти, които намаляват изследваната активност на ДАО.

Комбинация от ниска доза АГ (0.4 mg/животно) и тестостерон достоверно, но по-слабо изразено от самостоятелното действие на АГ, понижава активността на ДАО. Получените резултати от едновременното третиране с високи дози от инхибитора и с хормона, т.е. липсата на изразен ефект, ни дават основание да приемем, че АГ и тестостерона, въведени заедно в организма, взаимно се компенсират, което в крайна сметка не променя активността на ДАО. Така характерните за АГ и тестостерона ефекти – съответно инхибиране и стимулиране не се проявяват. Въз основа на получените данни и оскъдната информация в литературата не може да се направи категорично заключение за механизма, по който се неутрализират ефектите на двата фактора.

Най-вероятното обяснение за наблюдаваните резултати от комбинираното третиране с АГ и тестостерона върху активността на ДАО е, че двата ефектора действат независимо един от друг по характерните за тях механизми – тестостерона чрез андроген рецепторен медиран път, а АГ чрез свързване с С5 карбонилните групи от тофа-хинон, което имитира образуването на шифова база и блокира каталитичната дейност на ензима (Langley et al., 2008). Липсата на статистически значим ефект в този случай изглежда се дължи на неутрализирането на двете въздействия – инхибиторните свойства на АГ се компенсират от стимулиращия ефект на тестостерона, в резултат на което активността на ДАО остава близка до контролната. Не е изключено в този механизъм на компенсиране да се отразява и стимулиращият ефект на тестостерона върху NOS и новосинтезираните молекули NO да влияят на активността на ДАО и това да формира цялостното действие на тестостерона от комбинираното третиране.

6. Влияние на инхибитори на синтазите на азотен оксид върху диаминооксидазна активност

Следващата стъпка която предприехме е да изследваме NO като регулатор на ДАО, като за целта блокирахме ензимите от основния му биосинтезен път, а именно синтазите на NO. Използвани бяха L-NAME – селективен инхибитор на конститутивните NOS – невронална (nNOS) и ендотелна (eNOS) и неселективния L-NMMA – инхибиращ продукцията на NO и от трите изоформи на NOS. Специфичните константи на инхибиране за тези субстанции са дадени в табл. 5. Вижда се, че L-NAME проявява K_i спрямо nNOS и eNOS в наномоларни концентрации, които са около 100 пъти по-ниски от K_i за индуцируемата (iNOS). От своя страна L-NMMA инхибира и трите NOS с K_i в субмикромоларната и близката микромоларна област от концентрации.

Таблица 1. Константа на инхибиране (K_i) на L-NAME, L-NMMA и аминогуанидин

Инхибитор	K_i			Литература
	iNOS	eNOS	nNOS	
L-NAME	4.4 μ M (мишка)	39 nM (човек)	15 nM (говеда)	Buckner et al., 1988 Furfine et al., 1993 Garvey et al., 1994
L-NMMA	6.0 μ M (мишка)	0.4 μ M (човек)	0.18 μ M (плъх)	Frey et al., 1994 Garvey et al., 1994
Аминогуанидин	5.4 μ M (мишка)		160 μ M (плъх)	Misko et al., 1993

NO е важен медиатор в чернодробната физиология и патофизиология, като от основно значение са ендотелната и индуцируемата изоформи на NOS, докато nNOS се отличава с по-слаба експресия. Известно е, че в черен дроб NO се синтезира предимно от eNOS, която е отговорна за поддържането на чернодробната хомеостаза и която се потиска при патологични състояния (Iwakiri & Kim, 2015). В бъбреците данните за присъствието на iNOS са противоречиви – според едни автори не се експресира (Jarry et al., 2003; Mount et al., 2005), а според други е налична (Mohlaupt et al., 1994).

Получените резултати, показаха потискащ ефект както на L-NAME, така и на L-NMMA върху активността на ДАО в черен дроб и бъбреци. Мощен инхибиторен ефект върху активността на ДАО предизвикаха по-високите дози L-NAME (1 mg) и L-NMMA (0.9 mg), като тези ефекти са съизмерими с

инхибиторния ефект на АГ (0.4 mg). Ниската доза L-NAME (0.01 mg), за която се очаква, че потиска активностите на nNOS и eNOS, оказва по-слаб инхибиторен ефект върху изследвания от нас ензим. Тези резултати предполагат важна роля на NOS при поддържане на висока активност на ДАО, като по-голямата доза L-NAME и подобната такава на L-NMMA насочват по-специално към съществено участие на индуцируемия субтип iNOS.

7. Влияние на комбинирано третиране с L-NAME и тестостерон върху диаминооксидазна активност

Въпреки значимия инхибиторният ефект на L-NAME върху активността на ДАО и в двата изследвани от нас органа, в условия на комбинирано третиране с L-NAME и тестостерон, този ефект беше минимизиран в черен дроб и силно редуциран в бъбреци. Следователно се наблюдава неутрализиране на ефектите на тези две ефекторни молекули, които те оказват върху ДАО при самостоятелно въвеждане. Това се подкрепя от резултатите с дълговременно третиране на мъжки плъхове с тестостерон (2 седмици), което води до повишаване експресията на iNOS и повишени нива на NO в лайдигови клетки (Andric et al., 2010). Друг полов хормон – естрадиолът, във физиологични нива инхибира iNOS и съответно синтеза на NO в макрофаги чрез рецепторно-медиирания сигнален път на естрадиола (Hayashi et al., 1998). В условията на нашите експерименти обаче възможността за наличието на значими количества естрадиол е минимално и поради това изключваме възможността за участие на значими количества естрогени в наблюдаваните ефекти. От друга страна тестостеронът е способен да индуцира бърз синтез на NO от eNOS, при което повишените нива NO се запазват до 2 ч. след тестостеронова стимулация (Yu et al., 2010). Следователно можем да предположим, че биологичните ефекти на NO се проявяват за още по-дълго време. От тази гледна точка е възможно сумирането на ефектите на тестостерона върху ДАО и NOS, в резултат на което наблюдаваме известна редукция на инхибиторното действие на L-NAME или L-NMMA, когато са приложени в комбинация с тестостерон. В бъбреците стимулиращият ефект на тестостерона от съвместното му въздействие с L-NAME върху активността на ДАО показва по-слабо влияние.

8. Влияние комбинирано третиране с L-NAME и аминоксидантин върху диаминооксидазна активност

Едновременното третиране на мъжки плъхове с необратимите и селективни инхибитори на NOS – L-NAME (nNOS и eNOS) и АГ (iNOS и ДАО) понижи

активността на чернодробната ДАО. Третирането с тази комбинация от инхибитори дава възможност едновременно да се блокират трите изоформи на NOS, а също така и ДАО, което обяснява регистрираният по-мощен инхибиторен ефект, надвишаващ ефекта на всеки един от инхибиторите приложен поотделно.

В бъбреците ефектът от комбинираното действие на двата инхибитора върху активността на ДАО е по-слабо изразен и тя остава близко до контролните стойности.

Възможно е тестостеронът да действа на повече ензими от метаболизма на ПА и на NO, в резултат на което активността на ДАО остава близка до контролната в по-голяма част от проведените комбинирани третираня. Проведените експерименти и резултатите от тях са недостатъчни за точното описание на механизма, по който се неутрализират ефектите от комбинираните третираня с тестостерон.

Резултатите, които получихме от прилагането на инхибиторите на NOS – самостоятелно и в комбинация с тестостерон и АГ, върху активността на ДАО сериозно подкрепят хипотезата за участие на NO в регулацията на чернодробната и бъбречна ДАО в полово незрели мъжки плъхове.

9. Влияние на ODQ върху диаминооксидазна активност

Като следваща стъпка на изследване участието на NO в регулацията на ДАО предприехме блокиране на sGC, който е важен регулаторен ензим от сигналния път на NO. В резултат от активирането на sGC се повишават вътреклетъчните нива на вторичния посредник цГМФ, който медира голяма част от биологичните ефекти на NO. Така цГМФ повлиява активността на зависимите от него регулаторни протеинкинази, които избирателно фосфорилират специфични белтъци (йонни канали, калциеви помпи, регулиращи съкращението белтъци и др.), а това води до понижаване на вътреклетъчното съдържание на Ca^{2+} и при гладките мускули се наблюдава релаксация (Friebe & Koesling, 2003; Polakowska, 2016; Zheng et al., 2016). В черен дроб и бъбреци ензимът sGC се експресира от съдови и интерстициални клетки. Ензимът показва по-високи активности в бъбречната кора, в сравнение с бъбречната медула и в чернодробни клетки, като в последните две структури активността е почти еднаква (Theilig et al., 2001). Блокирането на този път ще инхибира продукцията на цГМФ и следователно ефектите на NO, които зависят от последващото активиране на зависимите от цГМФ протеинкинази и други клетъчни белтъци, няма да могат да се реализират. ODQ е известен и

широко използван специфичен инхибитор на sGC, който се използва като фармакологичен инструмент за идентифициране на ролята на sGC при иницираната от NO сигнална трансдукция (Zhao et al., 2000).

При нашите експериментални условия самостоятелно въведен ODQ доведе до слабо, недостоверно повишаване на активността на ДАО и в двата изследвани органа. Подобен ефект беше регистриран в резултат от третирането с комбинацията от ODQ и АГ, докато ODQ и тестостерон доведе до мощно повишаване на ДАО активността и в двата органа. Следователно ODQ не пречатства, а дори повишава ефекта на тестостерона - резултат, който е особено ясно изразен и значим в черен дроб на плъх.

ODQ приложен едновременно с инхибитора АГ показва повишаване на активността на ДАО, което е по-силно изразено в бъбреците. Изненадващо висока ДАО активност беше регистрирана вследствие на съвместното третиране с ODQ и тестостерон, по-висока дори от ефекта на самостоятелно приложени тестостерон в изследваните органи. Получените данни с ODQ ни дават основание да предположим, че продуцираният NO въздейства по алтернативен сигнален път, независещ от цГМФ. Това може да стане чрез нитрозилиране на ДАО/белтъци или чрез други ефекти на пероксинитритния радикал (ONOO^-) (Salvemini et al., 2006). Поради повишената си реакционна способност ONOO^- реагира с различни тиолови групи в цистеинови остатъци (S-нитрозилиране), с тирозинови остатъци в полипептидните вериги (тирозин нитриране), с ненаситени висши мастни киселини, с някои метал-съдържащи белтъци като хемоглобин (метал нитрозилиране) (Martí'inez-Ruiza & Lamasa, 2004; Salvemini et al., 2006) и др. Не е изключено някои описани ефекти на NO да са резултат от превръщането му в ONOO^- .

NO може да се образува и в процес на неензимно превръщане на нитритния анион в NO. Този път в повечето случаи се активира при анаеробни условия, каквито са характерни за исхемии, а също така и при ацидоза (Zweier et al., 1995). Образуването в следствие нитрозилен радикал притежава голяма биологична активност и води до увреждане на ДНК, прекисно окисление на липиди, окисление на белтъци, съдържащи тиолови групи, или нитриране на тирозинови остатъци (Wink & Mitchell, 1998).

Обобщена картина на дискутираните регулации и възможни пътища за въздействие върху активността на ДАО са представени на обобщена схема (фиг. 12).

10. Влияние на въглеродни наночастици върху диаминооксидазна активност

Въглеродните наночастици, благодарение на своите уникални физико-химични свойства притежават голям потенциал за приложение в сферата на биотехнологиите, на медицината, в екологията. В областта на медицината обещаващ напредък се бележи в ранната диагностика на множество медицински проблеми на субклетъчно ниво, както и в насочената доставка на лекарства само до точно определени прицелни клетки, без странични ефекти върху останалите тъкани и органи в организма. За целта е необходимо въглеродните наночастици да имат малки размери, лесно да проникват в тъканите и вътреклетъчните пространства, да притежават биосензорни свойства и не на последно място да са биосъвместими и нетоксични.

Разнообразието от наноматериали е голямо и продължава да нараства в резултат усилията на множество научни екипи, търсещи нови начини и подходи за тяхното използване. Естествено не трябва да се пренебрегва фактът, че колкото и полезни да се окажат, приложението им се ограничава от възможните вредни въздействия върху живите организми – растения, животни, човек.

Затова се насочихме към изследване токсичността на въглеродните наночастици в два основни хомеостатични органа – черен дроб и бъбреци, чрез мониториране на активността на ДАО в полово незрели женски плъхове. Тези органи, както и нервните клетки, са от първите, които биха били повлияни и евентуално увредени от наночастиците с всички произтичащи от това последствия за организма. Изследването проведохме в рамките на два експериментални подхода – при *in vitro* и *in vivo* условия, с цел по-пълна информация относно действието им върху изследвания от нас ензим. Данните получени в *in vitro* условия не показват директна „атака“ на въглерод-базираните наночастици върху ензимната молекула. *In vivo* опитите също не показаха значима промяната в активността на ДАО в черен дроб и бъбреци. Получените резултати ни дават основание да предположим, че изследваните въглеродни наночастици са потенциално нетоксични и не носят риск за здравето, доколкото може да се съди за това по активността на ДАО.

На този етап няма достатъчно данни и утвърдени стандарти относно начините за изследване токсичността на всякакви наночастици, поради което продължава работата по утвърждаване на методи и инструменти за откриване,

характеризиране, анализиране и обогатяване на информацията за негативни ефекти от използването на наноматериали в медицината и промишлеността.

В заключение резултатите, получени в настоящата работа, разкриват възможности за хуморална регулация на вътреклетъчните нива на ПА чрез мониторинг на активността на ДАО от тестостерон и NO, както при физиологични, така и при патофизиологични условия. ПА са от първостепенно значение за клетъчния растеж и диференциация, могат да се свързват с отрицателно заредени молекули като ДНК, РНК и мембранни фосфолипиди, модулират генната експресия, стабилизируют молекулата на ДНК и хроматина. Поради това поддържането на тяхната оптимална концентрация е от изключително значение за правилното функциониране на клетките, изграждащи органите и тъканите в живия организъм. За изследователите по-голям интерес представляват ензимите от биосинтезния път на ПА като антипролиферативен инструмент. Повишаването на активността на ензимите от катаболитните пътища не е за пренебрегване. ДАО редуцира вътреклетъчните ПА, като катализира окислителното дезаминиране на Пут, който е първият ПА от синтеза им. Освен това Пут се катаболизира под действието на ДАО до 4-аминобутирова киселина, притежаваща антипролиферативни свойства и това би могло да се използва успешно при патологични състояния като тумори. ДАО катализира и образуването на възпалителния медиатор хистамин. Във връзка с това модулирането на активността на ДАО ни разкрива възможности да разгледаме този ензим като част от превенцията на организма от натрупване на Пут и хистамин. Изследваните от нас ефекторни молекули тестостерон, АГ и инхибитори от синтезния и сигналния път на NO оказват значимо влияние на различни звена от метаболитния път на ПА. Тестостеронът предизвиква повишаване на активността на ДАО, но в същото време по литературни данни активира и ОДК и eNOS, а NO повишава ДАО активност.

Тестостеронът и NO са две молекули с важно значение за организма, а настоящото изследване ни показва техния потенциал като регулатори на ДАО. Обогатени са и знанията за взаимното им повлияване, което е от съществено значение за сложните биологични процеси, при които регулаторните механизми работят едновременно върху едни и същи клетъчни белтъци.

Въглеродните наночастици притежават огромно предимство пред останалите наночастици, защото са базирани на химичния елемент въглерод, който участва в структурите на всички живи организми и в милиони органични

съединения. Поради това въглеродните наночастици имат по-добра перспектива за биосъвместимост в сравнение с останалите наночастици. Това и уникалните им физико-химични свойства увеличават спектъра им на приложение. Предхождащи приложението на наночастици изследвания за токсичност са изключително важни. Двата важни хомеостатични органа – черен дроб и бъбреци, са задължителни при подобни изследвания, поради възможността от общи увреждания в резултат на повлияването на техните функции от наночастици, фармакологични агенти, ксенобиотици и др.

ИЗВОДИ

1. Диаминооксидазата в черен дроб и бъбреци на мъжки и женски полове незрели плъхове проявява най-висока активност при субстрат путресцин.

2. Потвърждава се активиращото действие на тестостерона върху диаминооксидазата при бъбреци на мъжки полове незрели плъхове. Този ефект се инициира от взаимодействието на тестостерона с андрогенния рецептор.

3. Инхибирането на ключовия ензим от биосинтезния път на полиамините – орнитиндекарбоксилаза, не оказва съществено влияние върху диаминооксидазната активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полове незрели плъхове. Ефектът на тестостерона не се повлиява в присъствието на инхибитора.

4. Аминогуанидинът инхибира диаминооксидазната активност в черен дроб и бъбреци на мъжки полове незрели плъхове.

5. Тестостеронът, добавен съвместно с аминогуанидин, възстановява частично диаминооксидазната активност.

6. Синтазите на NO стимулират диаминооксидазната активност при контролни условия в изследваните органи.

7. Блокирането на разтворимата гуанилатциклаза за разлика от синтазите на NO не инхибира ДАО, което предполага, че NO регулира

диаминооксидазата по механизъм, различен от основния му сигнален път: $\text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow \text{цГМФ} \rightarrow \text{биологичен ефект}$.

8. Тестостеронът частично реактивира диаминооксидазната активност в присъствие на инхибитораи на NOS, като възстановява контролните ѝ стойности.

9. Тестостеронът запазва своя стимулиращ ефект при блокирана разтворимата гуанилатциклаза.

10. Високи дози на въглеродни наночастици не оказват съществен ефект върху диаминооксидазата активност в черен дроб и бъбреци на плъх.

П Р И Н О С И

1. Установено е, че синтазите на NO повишават диаминооксидазната активност в изследваните органи от плъх по механизъм, който не зависи от основния сигнален път на NO, включващ веригата $\text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow \text{цГМФ} \rightarrow \text{биологичен ефект}$.

2. Установено е, че тестостеронът повишава диаминооксидазната активност в бъбреци на плъх.

3. Установена е, че тестостерон-зависима активация на диаминооксидазата, инициирана от взаимодействие на тестостерона с андрогенни рецептори.

4. Установено е, че тестостеронът повлиява катаболизма на полиамините чрез ензима диаминооксидаза по механизъм, независещ от тяхната биосинтеза в бъбреци на плъх.

5. Установено е, че въглеродните наночастици не оказват съществено влияние върху активността на ключов ензим от катаболизма на полиамините – диаминооксидаза, в основни хомеостатични органи черен дроб и бъбреци. Това предполага възможност за тяхната употреба за диагностични и терапевтични цели.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, ВКЛЮЧЕНИ В ДИСЕРТАЦИЯТА

Mishonova M, Dimitrov O, Sazdova I, Dimitrova D, Gagov H, 2017. Nitric Oxide Synthases and Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase Activity in Rat Liver and Kidney. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*: v 70(11), pp 1549-1556. IF 2016/0.251

Alexandre Loukanov, Hristo Gagov, **Milena Mishonova**, Seiichiro Nakabayashi, 2018. Biocompatible Carbon Nanodots for Functional Imaging and Cancer Therapy: Progress and Perspectives. *Internal Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCE)*: v 7(2), pp 31-45.

Milena Mishonova, Hristo Gagov, 2018. Regulation of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Activity by Testosterone: Role of Androgen Receptor, Ornithine Decarboxylase and Nitric Oxide Synthases. *Annual of Sofia University „St. Kliment Ohridski“*, Faculty of Biology, Book 4 (*in press*)

УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТЕМАТИКАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Milena Mishonova, Hristo Gagov. Testosterone as Diamine Oxidase Activity Regulator. World BioDiscovery Congress 2017, 17-19 July 2017, Sofia, Bulgaria. *BioDiscovery* 20: e17372; doi: 10.3897/biodiscovery.20.e17372

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам най-искрена благодарност към научния си ръководител проф. д-р Христо Гагов, за неговата подкрепа и настойчивост, без които този дисертационен труд нямаше да бъде реализиран. Благодаря му за ценните знания и съвети, за компетентното ръководство на всеки един етап от създаването на настоящия труд.

Признателна съм на колегите от катедрата за доброто отношение към мен през всичките години, в които работихме заедно. Специални благодарности изказвам на биолог Нели Райкова за безкористната помощ при провеждането на всеки един експеримент, на доц. Мариела Чичова за оказаното съдействие във финалните етапи от работата си.

Благодаря на доц. Александър Луканов от Факултета по инженерни и природни науки, Университет Сайтама, Япония за предоставените въглеродни наночастици.

Благодаря от цялото си сърце на семейството си за проявеното търпение, разбиране и подкрепа.