

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ НА MIF-1 И TYR-MIF-1 ПРИ ТРИ МОДЕЛА НА СТРЕС

А. Бочева и Е. Джамбазова

Катедра „Патофизиология“, МУ – София

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MIF-1 AND TYR-MIF-1 IN THREE MODELS OF STRESS

A. Bocheva and E. Dzhambazova

Department of Pathophysiology, Medical University – Sofia

Резюме: Пептидите от семейството на Tyr-MIF-1 – MIF-1 и Tyr-MIF-1, имат опиоидно и антиопиоидно действие. Известно е, че стресът активира процесите на формиране на свободни радикали – нестабилни химични частици, които нарушават клетъчната хомеостаза на организма. Освен това опиоидните пептиди могат да модулират образуването на свободни радикали. До този момент не са известни данни за ефектите на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху радикалообразуването и тъканното увреждане в норма и след стрес. Целта на изследването бе изучаване антиоксидантната активност на двата невропептида при три модела на стрес – имобилизационен (IS), студов (CS) и топлинен (HS) стрес, в мозък и кръвна плазма. Получените резултати показваха: 1) MIF-1 и Tyr-MIF-1 в интактни животни са антиоксиданти в мозъка и прооксиданти в кръвната плазма; 2) MIF-1 и Tyr-MIF-1 след трите вида стрес имат антиоксидантен ефект върху радикалообразуването в мозъка и кръвната плазма, с изключение на MIF-1 след топлинен стрес в кръвната плазма; 3) MIF-1 и Tyr-MIF-1 след имобилизационен и топлинен стрес имат AOA само върху тъканното увреждане в мозъка.

Key words: MIF-1, Tyr-MIF-1, стрес, антиоксидантна активност

Адрес за кореспонденция: Доц. д-р Адриана Бочева, Катедра по патофизиология, Медицински университет, ул. „Здраве“, № 2, 1431 София, e-mail: adriana_bocheva@abv.bg

Изследването е осъществено благодарение на Договор ВУ-Л-04/05 с Националния фонд за научни изследвания към МОН, София, България.

Summary: Peptides of the Tyr-MIF-1 family – MIF-1 and Tyr-MIF-1, have antioioid and opioioid-like effects. It is known that stress leads to formation of excessive free radicals – extremely reactive and unstable chemical species, which are a major internal threat to cellular homeostasis of aerobic organisms. Furthermore, opioioid peptides have been recognized as modulators of reactive oxygen species (ROS). So far no data about direct scavenger properties of Tyr-MIFs peptides were available. The aim of our study was to investigate the antioxidant activity of MIF-1 and Tyr-MIF-1 after immobilization (IS), cold (CS) and hot (HS) stress in brain and blood plasma. We found that: 1) MIF-1 and Tyr-MIF-1 in intact animals showed antioxidant effects in brain and pro-oxidant – in blood plasma; 2) MIF-1 and Tyr-MIF-1 after three different models of stress showed antioxidant effects on ROS in brain and blood plasma with exception of MIF-1 after HS in blood plasma; 3) MIF-1 and Tyr-MIF-1 after IS and HS showed antioxidant activity on tissue damage in brain.

Key words: MIF-1, Tyr-MIF-1, stress, antioxidant activity

Address for correspondence: Assoc. Prof. Adriana Bocheva, Chair of Pathophysiology, Medical University, 2 Zdrave str., Bg – 1431 Sofia, e-mail: adriana_bocheva@abv.bg

This paper was supported by Grant VU-L-04/05 of the National Science Fund, Sofia, Bulgaria.

Семейството Tyr-MIF-1 пептиди, включващо MIF-1, Tyr-MIF-1, Tyr-W-MIF-1 и Tyr-K-MIF-1, е част от ендогенната опиоидергична система. Те притежават аналгетични ефекти, взаимодействат с опиоидни рецептори [10]. MIF-1 има слаб афинитет към μ -рецепторите, докато Tyr-MIF-1 взаимодейства и с δ - и κ -рецепторите, което

обуславя изразения му аналгетичен ефект [10, 19, 20].

Известно е, че стресът активира процесите на свободнорадикалното прекисно окисление на липидите (ПОЛ) и повишава съдържанието на активни форми на кислорода (АФК) и свободните радикали [2, 3, 9].

Оксидативният стрес е един от основните патогенетични механизми на редица болести и болестни състояния – стресови състояния, атеросклероза, авитаминози, остри и хронични чернодробни заболявания, СПИН, исхемична болест на сърцето и инфаркт на миокарда, артрити, ревматизъм, катаракта, невродегенеративни увреждания – синдром на Алцхаймер, процеси на стареене и др. [1, 4, 11, 17].

Известно е, че имобилизационен, студов и топлинен стрес причиняват оксидативни увреждания на белтъци, липиди, ДНК в мозъка на плъхове [6, 12, 13].

В достъпната ни литература не намерихме данни, дали невропептидите MIF-1 и Tug-MIF-1 оказват влияние при оксидативни увреждания. Ето защо цел на изследването бе да изучим ефектите им върху оксидативни процеси при имобилизационен, студов и топлинен стрес.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Животни: Опитите се проведеха върху мъжки бели плъхове порода Wistar (180-200 g), отглеждани при нормални условия – 22°C, с достъп на храна и вода *ad libitum*. Всяка група съдържа 6 животни. Всички опити бяха проведени между 9.00 и 12.00 ч.

Опитите бяха извършени съгласно изискванията на Международната асоциация за изследване на болката [22] и ЕКНМ към МУ – София.

Методи за предизвикване на стрес

Имобилизационен стрес – Животните се поставят за 4 часа в специални, ограничаващи движенията им прозрачни пластмасови цилиндри с отвори за дишане.

Студов стрес – Животните се поставят за 4 часа в хладилна камера при температура 4°C.

Топлинен стрес – Животните се поставят за 1 час при температура 38°C.

Изследваните пептиди бяха въведени в доза 1 mg/kg интраперитонеално (i.p.) след имобилизационен, студов или топлинен стрес. Контролни групи бяха животни, подложени на съответния стрес, инжектирани с физиологичен разтвор в обем 1 ml/kg (i.p.).

Получаване на тъканен хомогенат – отпарариран мозък се поставя във физиологичен разтвор на ледена баня. Хомогенизирането беше извършено с помощта на хомогенизатор при 2000 об./min;

Получаване на кръвна плазма. Кръвта беше събирана в епруветки на ледена баня и веднага центрофугирана при 2500 об./min за 10 min при температура 4°C.

В опити *in vitro* бяха изучени ефектите на MIF-1 и Tug-MIF-1 върху оксидативния статус след инкубиране на тъкан или плазма (съдържаща 1 mg протеин) с 10⁻⁴ M разтвори на пептидите в продължение на 5 min при температура +4°C.

Определяне на белтък по метода на Буурет (Slater, 1986) [14].

Определяне на MDA чрез измерване на TBARS (Joswik, 1999) [5]. Влиянието на даден фактор върху нивото на MDA бе оценявано при използването на спектрофотометричен скевинджинг-индекс (SPh-SI), определен по формулата:

$$SPh - SI = \frac{Abs_{532nm}^{sample}}{Abs_{532nm}^{control}} * 100, (\%),$$

където индексът "Sample" означава проба от тъкан на животно, подложено на някакво влияние, а "Control" – проба от същата тъкан, но от животно, неизложено на това влияние.

Определяне на общото радикалообразуване при използване на MTT (Traykova, 2004) [16].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

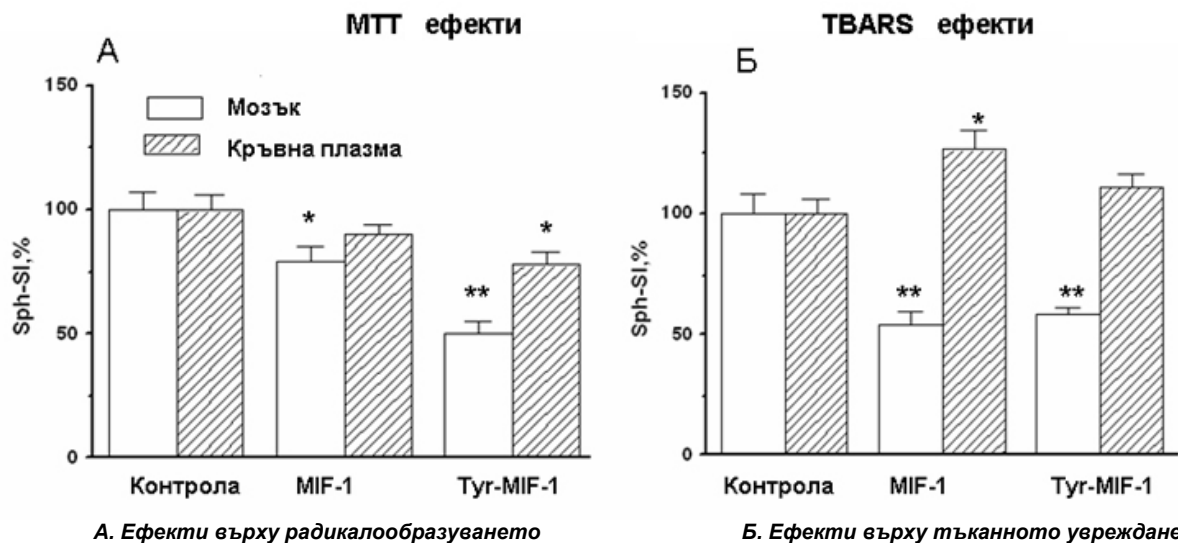
Опитите бяха проведени в две серии:

I. Опити in vitro. Ефекти на MIF-1 и Tug-MIF-1 върху оксидативния статус след инкубиране на тъкан или плазма (съдържаща 1 mg протеин) с 10⁻⁴ M разтвори на пептидите в продължение на 5 min при температура +4°C.

MIF-1 и Tug-MIF-1 притежават антиоксидантна активност (АОА), като потискат общото радикалообразуване в мозък и кръвна плазма, като активността на MIF-1 ($p < 0.05$) е по-слабо изразена в сравнение с тази на Tug-MIF-1 ($p < 0.01$). Tug-MIF-1 статистически достоверно потиска радикалообразуването в мозъка в сравнение с контролата и MIF-1 (фиг. 1А).

Получените резултати при измерване на тъканното увреждане показаха, че двата пептида имат статистически достоверно антиоксидантно действие в мозък ($p < 0.01$) и прооксидантно действие в кръвна плазма, което е по-слабо при Tug-MIF-1 в сравнение с това при MIF-1 ($p < 0.05$) (фиг. 1Б).

Противоположните ефекти на MIF-1 и Tug-MIF-1 в мозък и кръвна плазма биха могли да се обяснят с различната химична структура на двата пептида, от една страна, а от друга, с различното съдържание на липиди и протеини в тях. Ето защо MIF-1 и Tug-MIF-1 имат антиоксидантно действие в мозък и прооксидантно действие в кръвна плазма, протективно действие по отношение на липидите, но не и спрямо протеините.



Фиг. 1. Ефекти на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху оксидативния статус *in vitro* след инкубиране на тъкан или плазма (съдържаща 1 mg протеин) с 10^{-4} M разтвори на пептидите в продължение на 5 min при температура +4°C

II. In vivo. Ефекти на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху радикалообразуването и тъканното увреждане при животни, инжектирани с пептидите (1 mg/kg, i.p.) след всеки един от стресовите.

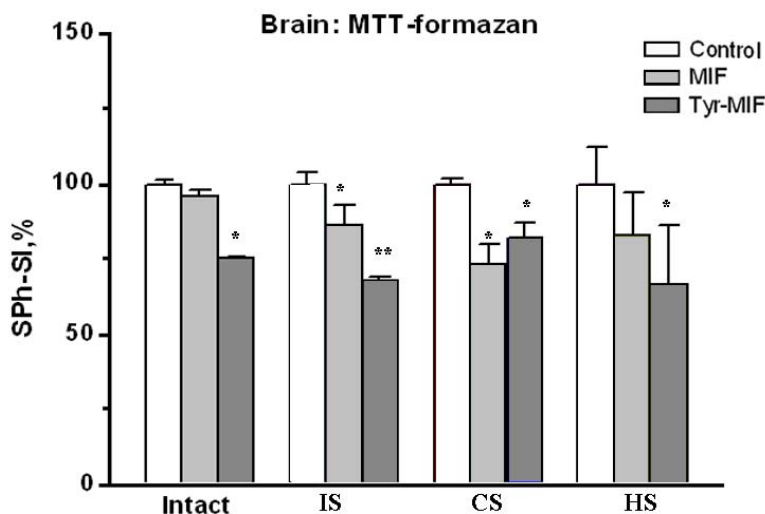
При животни след имобилизационен стрес MIF-1 има стойности и при двата вида тъкан, близки до тази на контролата, т.е. няма AOA (фиг. 2 и 3). Ефектите на Tyr-MIF-1 в мозък ($p < 0.01$) и в кръвна плазма ($p < 0.05$) върху радикалообразуването са статистически достоверно понижени спрямо контролата и MIF-1 (фиг. 2 и 3).

След четиричасов студов стрес в мозъчна тъкан MIF-1 и Tyr-MIF-1 показаха статистически достоверна антиоксидантна активност ($p < 0.05$) (фиг. 2), докато в кръвна плазма AOA показва Tyr-MIF-1 ($p < 0.05$) (фиг. 3).

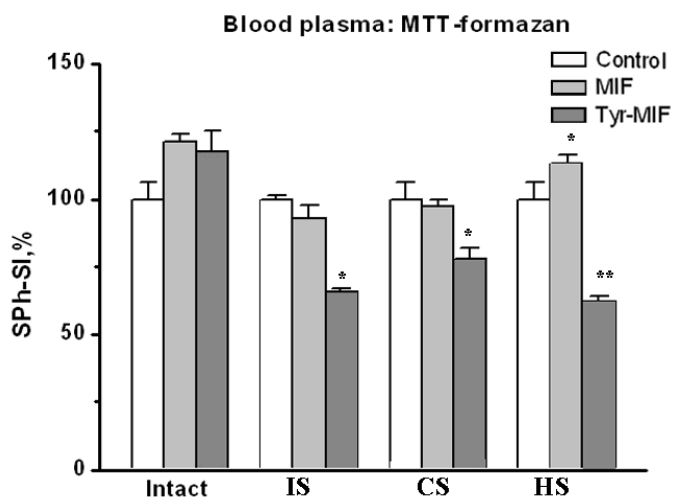
След едночасов топлинен стрес статистически достоверна AOA в мозък ($p < 0.05$) и кръвна плазма ($p < 0.01$) показва Tyr-MIF-1, докато MIF-1 и в двете тъкани нямаше ефект (фиг. 2 и 3).

След имобилизационен стрес спектрофотометрично бе отчетено, че MIF-1 и Tyr-MIF-1 имат статистически достоверно понижено тъканно увреждане в мозъчна тъкан ($p < 0.05$), докато в кръвна плазма те нямат ефект (фиг. 4 и 5).

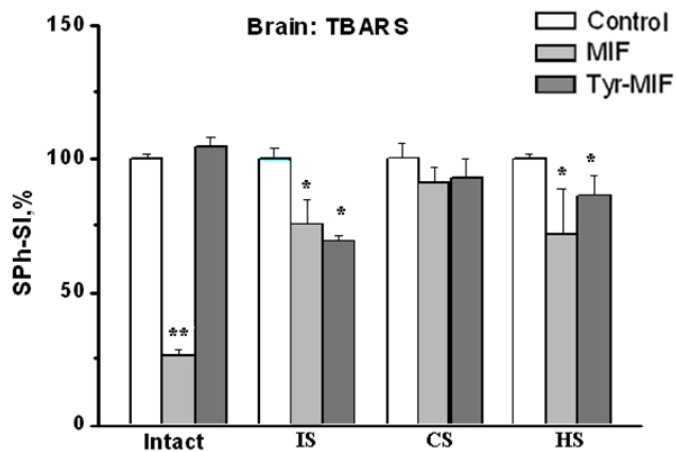
След подлагане на студов стрес двата пептида не повлияват тъканното увреждане в мозъка и кръвната плазма (фиг. 4 и 5). След топлинен стрес MIF-1 и Tyr-MIF-1 не повлияват тъканното увреждане в плазма (фиг. 5), докато в мозък и двата пептида имат слаба антиоксидантна активност ($p < 0.05$) (фиг. 4).



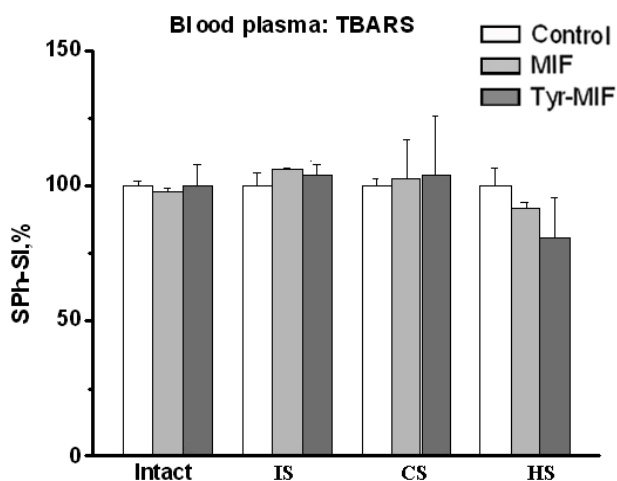
Фиг. 2. Ефекти на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху общото радикалообразуване в мозъка при интактни животни (Intact) и при животни след имобилизационен (IS), студов (CS) и топлинен (HS) стрес. Влиянието на пептидите върху нивото на малондиалдехида (MDA) е представено чрез спектрофотометричен сквинджинг-индекс SPh-SI



Фиг. 3. Ефекти на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху общото радикалообразуване в кръвната плазма при интактни животни (Intact) и при животни след имобилизационен (IS), студов (CS) и топлинен (HS) стрес. Влиянието на пептидите върху нивото на малондиалдехида (MDA) е представено чрез спектрофотометричен скевинджинг-индекс SPh-SI



Фиг. 4. Ефекти на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху тъканното увреждане в мозъка при интактни животни (Intact) и при животни след имобилизационен (IS), студов (CS) и топлинен (HS) стрес. Влиянието на пептидите върху нивото на малондиалдехида (MDA) е представено чрез спектрофотометричен скевинджинг-индекс SPh-SI



Фиг. 5. Ефекти на MIF-1 и Tyr-MIF-1 върху тъканното увреждане в кръвната плазма при интактни животни (Intact) и при животни след имобилизационен (IS), студов (CS) и топлинен (HS) стрес. Влиянието на пептидите върху нивото на малондиалдехида (MDA) е представено чрез спектрофотометричен скевинджинг-индекс SPh-SI

Литературните данни показват, че ендорфините и ендогенните опиоидни пептиди имат антиоксидантен ефект срещу увреждания в резултат на образуване на свободни радикали в мозъка [7, 15]. Нашите данни за MIF-1 и Tyr-MIF-1 показваха също антиоксидантен ефект в мозък.

Известно е, че имобилизационният стрес причинява оксидативни увреждания на белтъци, липиди, ДНК в мозъка на плъхове [6, 8].

При студов и топлинен стрес се наблюдава нарушен баланс между оксидантна и антиоксидантна система – промени в протеиновата оксидация и в липидната пероксидация [12, 13, 18, 21].

Получените резултати ни дават основание за следните **изводи**:

1. MIF-1 и Tyr-MIF-1 в интактни животни са антиоксиданти в мозъка и прооксиданти в кръвната плазма.

2. MIF-1 и Tyr-MIF-1 и след трите вида стрес имат антиоксидантен ефект върху радикалообразуването в мозъка и кръвната плазма, с изключение на MIF-1 след топлинен стрес в кръвната плазма.

3. MIF-1 и Tyr-MIF-1 след имобилизационен и топлинен стрес имат АОА само върху тъканното увреждане в мозъка.

Изказваме благодарност на научния колектив, ръководен от доц. Т. Трайков, Катедра „Физика и биофизика“ при МУ – София, за предоставената материална база и изпълнението на поставените експериментални задачи.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ames, B. N., M. K. Shigenaga et T. M. Hagen. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of the aging. – Proc. Natl. Acad. Sci., **90**, 1993, 7915-7922.
2. Chetverikova, L. K. et al. Factors of antiviral resistance in the pathogenesis of influenza in mice. – Vestn. Acad. Med. Nauk SSSR, **11**, 1989, 63-68.
3. Chetverikova, L. K. et L. I. Inozemtseva. Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of influenza and search for antiviral protective agents. – Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk SSSR, **3**, 1996, 37-40.
4. Haugen, O. Do we need more ACE inhibitors? – Tidsskr. Nor. Laegeforen., **110**, 1990, № 11, 1411.
5. Joswik, M. et al. Oxidative stress markers in preovulatory follicular liquid in humans. – Mol. Hum. Reprod., **5**, 1999, № 5, 409-413.
6. Lata, H. et al. Effect of immobilization stress on lipid peroxidation and lipid profile in rabbits. – Indian J. Clin. Biochem., **19**, 2004, № 2, 1-4.
7. Lin, X. et al. Endomorphins, endogenous opioid peptides, provide antioxidant defense in the brain against free radical-induced damage. – Biochim. Biophys. Acta, **1639**, 2003, № 3, 195-202.
8. Liu, J. et al. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. – FASEB J., **13**, 1996, 1532-1538.
9. Peterhans, E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. – Biol. Trace Element Research, **56**, 1997, 107-115.
10. Reed, G. W., G. A. Olson et R. D. Olson. The Tyr-MIF-1 family of peptides. – Neurosci. Biobehav. Rev., **18**, 1994, 519-525.
11. Rice-Evans, C. Effect of reactive oxygen species on the erythrocyte calcium pump function in protein-energy malnutrition. – In: Free radicals, Oxidant Stress and Drug Action. London, Richelieu Press, 1987, 425.
12. Sahin, E. et S. Gumuslu. Cold-stress-induced modulation of antioxidant defence: role of stressed conditions in tissue injury followed by protein oxidation and lipid peroxidation. – Int. J. Biometeorol., **48**, 2004, № 4, 165-171.
13. Shustanova, T. A., T. I. Bondarenko et N. P. Miliutina. Free radical mechanism of the cold stress development in rats. – Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova, **90**, 2004, № 1, 73-82.
14. Slater, R. T. Experiments in Molecular Biology. Clifton, New Jersey, Humana Press, 1986, p. 269.
15. Sobocanec, S. et al. Met-enkephalin modulation of age-related changes in red cell antioxidant status. – Physiol. Res., **54**, 2005, № 1, 97-104.
16. Traykova, M., T. Traykov et V. Petrova. Effect of galantamine hydrobromide on the reactive oxygen species released by rats peritoneal macrophages. – Compt. Rend. Bulg. Acad. Sci., **57**, 2004, № 10, 93-96.
17. Winkler, B. et al. Oxidative damage and age-related macular degeneration. – Mol. Vis., **5**, 1999, 32.
18. Yang, C. Y. et M. T. Lin. Oxidative stress in rats with heatstroke-induced cerebral ischemia. – Stroke, **33**, 2002, № 3, 790-794.
19. Zadina, J. E. et al. Hemorphins, cytochrome and human b-casomorphins bind to antiopiate (Tyr-MIF-1) as well as opiate binding sites in rat brain. – Life Sci., **47**, 1990, 25-30.
20. Zadina, J. E. et al. Mu, delta, and kappa opiate receptor binding of Tyr-MIF-1 and of Tyr-W-MIF-1, its active fragments, and two potent analogs. – Life Sci., **55**, 1994, 461-466.
21. Zhang, H. J. et al. Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. – FASEB J., **17**, 2003, № 15, 2293-2295.
22. Zimmerman, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. – Pain, **16**, 1983, 109-110.

Постъпила – 27 юли 2007 г.