

Selenium relieves inflammation in oxidized-LDL activated platelets via p38MAPK pathway

Karimi P¹, Bayat Makou R^{2*}, Dehgan P³, Salimi Movahed MR⁴

1. Department of Clinical Biochemistry and Medical Laboratories, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Faculty of Medicine, Islamic Azad University Tabriz Medical Sciences Branch, Tabriz, Iran
3. Faculty of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Student of Dentistry, International Branch of Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 12 Oct 2013, Accepted: 20 Feb 2014

Abstract

Background: Selenium is a unique trace element which is beneficial on inflammatory underlining diseases. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways regulate several cellular functions including inflammation, cell differentiation, migration, and apoptosis. This study aimed to find out the pathway(s) by which Selenium modifies inflammatory events in oxidative or thrombotic induced stress in platelets.

Material and Methods: This is a basic-experimental study on human platelets obtained from 30 healthy individuals (age 35±12). The phosphorylation rate of P38MAPK, c-Jun N-terminal Kinase (c-JNK), and Extracellular Signal-Regulated Kinases1/2(ERK1/2) as three important proteins in MAPK family and P-selectin were measured in presence or absence of selenium by ELISA (solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay). Pharmacological inhibition was done by inhibitors of P38MAPK, ERK1/2 and c- JNK in order to compare with selenium effects. The percentage of ratio of phosphorylated to total protein was used for normalizing the phospho protein contents of platelets.

Results: Selenium significantly reduced P-selectin expression (p<0.05), P38MAPK (p<0.05) and c- JNK phosphorylation (p<0.05) induced by cu²⁺oxidized LDL in platelets but Se could not significantly reduce thrombin induced P-selectin despite of decreasing in mentioned phospho-proteins.

Conclusion: Our results indicated that Selenium can reduce inflammation via suppression of p38MAPK-dependent signaling pathway. These results may provide insights related to development of novel Selenium therapies in atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, Mitogen-Activated Protein Kinase, Selenium

Corresponding author:

Adress: Department of biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
E mail: pouran.karimi@yahoo.com

سلنیوم التهاب در پلاکت‌های فعال شده با LDL اکسید شده را با اثر بر مسیر p38MAPK کاهش می‌دهد

پوران کریمی^{1*}، روشک بیات ماکو²، پروین دهقان³، محمد رضا سلیمی موحد⁴

1. دانشجوی PhD بیوشیمی بالینی، بخش بیوشیمی و آزمایشگاه‌های بالینی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
2. مربی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد واحد تبریز، تبریز، ایران
3. دانشجوی PhD تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
4. دانشجوی دندان پزشکی، شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: 92/7/20 تاریخ پذیرش: 92/12/7

چکیده

زمینه و هدف: سلنیوم عنصر منحصر به فردی است که در بهبود بیماری‌های التهابی اثر مثبت دارد مسیر التهابی (MAPK) پروتئین کینازهای فعال شونده با میتوزن (اعمال سلولی شامل پرولیفراسیون، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. هدف از این مطالعه پیدا کردن مکانیسم اثر سلنیوم بر وقایع التهابی در پلاکت‌هایی است که در معرض استرس اکسیداتیو یا عوامل ترومبوتیک قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک مطالعه پایه‌ای-تجربی می‌باشد که روی پلاکت‌های انسانی به دست آمده از 30 نفر فرد سالم (سن 12 ± 35) انجام شده است در این پلاکت‌ها تغییرات سطح فسفوریلاسیون سه پروتئین مهم مسیر MAPK یعنی p38، c-jun kinase، ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) و میزان بیان p-سلکتین پلاکتیدر حضور و عدم حضور سلنیوم با روش الایزای سانویچی مورد اندازه گیری قرار گرفت. مهار دارویی برای مقایسه اثر سلنیوم با مهار کننده‌های کلاسیک کینازهای مربوط به فسفوریلاسیون p38، ERK1/2 و JNK اعمال شد. نسبت درصد فسفریله به توتال برای نرمالیزه کردن نتایج فسفوریلاسیون پروتئین‌ها محاسبه و در ارائه نتایج مورد استفاده واقع شد.

یافته‌ها: سلنیوم بیان p-سلکتین و سطح فسفوریلاسیون p38، JNK و ERK1/2 پلاکتی را به طور معنی‌دار در پلاکت‌های تحریک شده با ox-LDL کاهش داد ($p < 0/05$). سلنیوم نتوانست سطح p-سلکتین پلاکتی را علی‌رغم کاهش در سطح فسفوریلاسیون p38، JNK و ERK1/2 در پلاکت‌های فعال شده با ترومبین به طور معنی‌دار کاهش دهد.

نتیجه گیری: یافته‌های ما نشان دادند که سلنیوم می‌تواند التهاب را از طریق کاهش سرکوب مسیر پیام رسانی وابسته به p38 اعمال کند. این نتایج باعث توسعه دیدگاه سلنیوم درمانی در تخفیف التهاب ناشی از استرس اکسیداتیو در بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود.

واژگان کلیدی: آترواسکلروز، پروتئین کیناز فعال شونده با میتوزن، سلنیوم

*نویسنده مسئول: بخش بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

Email: pouran.karimi@yahoo.com

مقدمه

آترواسکلروزیس یکی از علل مهم مرگ و میر در بیماری‌هایی با زمینه التهابی است (1). پلاکت‌ها نه تنها در هوستاز و انعقاد خون بلکه در تشکیل پلاک‌های آترواسکلروتیک نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. پلاکت‌ها شروع برخی مسیرهای التهابی را با آزاد کردن سیتوکین‌ها واسطه‌گری می‌کنند (2). تحریک گیرنده‌های خانواده Toll-like receptor (TLRs) برخی آبتشارهای فسفریلاسیون را در پروسه "فعال شدن وابسته به استرس اکسیداتیو" پلاکت‌ها راه اندازی می‌کند (3). اولین هدف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) پروتئین‌های پلاکتی مخصوصاً پروتئین‌های غشایی این سلول‌های بدون هسته هستند (4).

لیپوپروتئین‌های کم چگال اکسید شده (ox-LDL) با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پروسه تشکیل پلاک مداخله می‌کنند و نیز در پراکسیداسیون لیپیدها و فعال‌سازی پلاکت‌ها نقش اساسی دارند. هم‌چنین در مطالعات قبلی دیده شده که تراکم ox-LDL باعث کاهش نیمه عمر پلاکت‌ها و افزایش حساسیت و تجمع پلاکتی می‌شود (5، 6). پلاکت‌های خون محیطی مستعد آسیب با عوامل اکسیدان و آپوپتوز هستند (7). کاسپازها که گروهی از سیستمین پروتئازها به شمار می‌روند واسطه این پروسه هستند و با بیان فسفاتیدیل سرین‌ها در سطح خارجی سلول‌ها در مراحل اولیه آپوپتوز همراهند (8).

p-سلکتین یکی از مولکول‌های چسبندگی مهم و مارکر التهابی شناخته شده است که در سطح سلول‌های اندوتلیال و پلاکت‌ها بارز می‌شود. این نوع اخیر p-سلکتین پلاکتی (platelet P-selectin/p-Pselectin) نامیده می‌شود و در گرانول‌های پلاکت‌های آرمیده اندوخته می‌شود (9) و به آرامی در خون آزاد می‌شود که به p-سلکتین سرمی (s-p-selectin) معروف است. مقادیر زیادی از این پروتئین به محض تحریک در سطح پلاکت‌ها بیان می‌شود. شواهد جدید نشان می‌دهد که خانواده پروتئین کینازهای فعال شونده با میتوزن Mitogen Activated

Protein Kinase (MAPK) در وقایع التهابی نقش کلیدی دارند (10) JNK، c-ERK1/2 و p38MAPK سه عضو مهم این خانواده هستند (11) که به محض این که قرار گرفتن پلاکت‌ها در معرض استرس اکسیداتیو (12) شوکاسمیتیک، سیتوکین‌های التهابی و یا فاکتورهای رشد (13) فسفریله می‌شوند و برخی آبتشارهای التهابی را فعال می‌کنند.

ترومبین به عنوان قوی‌ترین عامل فعال‌کننده پلاکت‌ها، به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است (14) رکس و همکارانش نشان دادند که ترومبین از پروتئاز فعال شونده با گیرنده 1 protease activated receptor and 4 (PAR1/4) برای فعال کردن پلاکت‌ها استفاده می‌کند که نهایتاً به p38MAPK-NF-κB signaling منجر می‌شود (13، 14) در مطالعه آنها کیتیک فسفریلاسیون و c-JNK، ERK1/2 و p38MAPK در پلاکت‌های فعال شده با ترومبین و ox-LDL مقایسه گردید (14، 15) و تفاوت فسفریلاسیون این پروتئین‌های التهابی در پلاکت‌های در معرض این دو آگونیست با اثبات رسیده است.

مهارکننده‌های کلاسیک ERK، P38kinase و JNK kinase به ترتیب SB203580، PD980559 و SP6000125 هستند که به طور شایع برای مطالعه مسیرهای التهابی MAPK به کار می‌روند و به عنوان عوامل ضد التهابی کاربرد دارند (16).

سلنیوم جزئی از آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز است (17). که سلول‌ها را در مقابل اثرات لیپید پراکسیدازی وسیع ROSها محافظت می‌کند (18) شواهد زیادی مبنی بر سودمندی استفاده از سلنیوم در بیماران مبتلا به فشار خون (19) آترواسکلروز (20) برخی اشکال سرطان (21) و بیماری‌های التهابی در دسترس می‌باشد سلنیوم نقش تنظیم‌کننده سیستم آنتی‌اکسیداتیو التهابی دارد (22). علی‌رغم این که نقش سلنیوم به طور گسترده در شرایط مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. مکانیسم اثر سلنیوم و سلنوپروتئین‌ها کمتر مورد توجه بوده هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم اثر سلنیوم بوده و این که چگونه سلنیوم بیان p-سلکتین را

از کولتر کانتر مدل (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) برای شمارش پلاکت‌ها استفاده شد. میانگین تعداد پلاکت‌ها در هیچ یک از گروه‌ها تفاوت معنی دار نداشت ($p=0/548$).

اکسیداسیون LDL

LDL تجاریدر مقابل بافر فسفات نمکی (10 میلی مولار NaH_2PO_4 ، 120 میلی مولار NaCl ، 2/7 میلی مولار KCl و pH 7/4) دیالیز گردید و سپس در مجاورت سولفات مس 10 میکرومولار به مدت 24 ساعت و در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. مالون دی آلدئید به عنوان اندکس پراکسیداسیون لیپیدی مورد اندازه گیری قرار گرفت.

انکوباسیون پلاکت‌ها با فعال کننده‌ها و مهار کننده‌ها و سلنیوم

پلاکت‌های آماده شده در سه گروه جداگانه تقسیم بندی شدند. گروه کنترل یا آرمیده (RP) بدون هیچ انکوباسیون، گروه دوم، پلاکت‌های تحریک شده با 50 میکروگرم در هر میلی لیتر $\text{oxidized treated platelets-cu}^{2+}$ (OP) و گروه سوم پلاکت‌های تحریک شده با 0/5 واحد در میلی لیتر ترومبین (Thrombin-activated platelets) (TP) بودند انکوباسیون با محرک‌ها به مدت 10 دقیقه برای مطالعه فسفو پروتئین‌ها و 24 ساعت برای بیان p-سلکتین انجام شد. مقدار لازم محرک برای فعال کردن پلاکت‌ها پس از تست تجمع پلاکتی با اگرگومتر (Dual Channel Laser Platelet Aggregation Analyzer/Counter Biola, Russia, Moscow تعیین شد.

برای بهتر روشن شدن اثر سلنیوم، بیان p-سلکتین و فسفریلاسیون هر سه پروتئین ERK1/2 ، p38 و c-JNK در دو گروه OP و TP قبل و بعد از انکوبه کردن با 100 نانو مول در لیتر سلنیوم اندازه گیری شد. هم چنین جهت مقایسه‌ی اثر مهارکنندگی سلنیوم با ضد التهاب‌های کلاسیک، پیش-انکوباسیون با 5×10^3 نانو مول در هر لیتر (شماره کاتالوگ 5633 cell signaling)، SB203580

در پلاکت‌ها کاهش می‌دهد و التهاب ناشی از عوامل محرک مانند oxLDL یا ترومبین را کم می‌کند. چنین به نظر می‌رسد که سلنیوم مقابله با عوامل اکسید کننده و تثبیت وضعیت اکسیداسیون و احیا را نه تنها با واسطه آنزیم گلو تاتیون پراکسیداز بلکه با اثر بر روی فعالیت کینازها و یا فسفریلازهای خانواده MAPK به عنوان شناخته شده ترین مسیرهای التهابی اعمال می‌کند (23).

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه بنیادی بر روی پلاکت‌های انسانی است. نمونه‌های خون کامل وریدی از 35 داوطلب سالمی که در طول 30 روز گذشته هیچ نوع مداخله پزشکی نداشتند گرفته شد. تمام داوطلبان (سن 35 ± 12) برای شرکت در مطالعه آمادگی خود را اعلام کردند. هم چنین نمونه‌ها مطابق با قوانین کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردیدند. اعمال معیار p-سلکتین سرمی بیش از 40 نانوگرم در میلی لیتر منجر به خروج 5 نمونه از مطالعه گردید. تمام کیت‌ها و مهار کننده‌ها از شرکت cell signaling خریداری شد.

تهیه پلاکت

نمونه‌های خون کامل به محلول سیترات دکستروز (65 میلی مولار سیتریک اسید، 85 میلی مولار سیترات و 111 میلی مولار گلوکز به نسبت 1/9/8/1 v/v) اضافه شد و سپس در $200 \times g$ به مدت 8 دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردید (سانتریفوژ مدل بکمن) و در مایع رویی پلاسما غنی از پلاکت (platelet rich plasma) حاصل شد و سپس در دور $2000 \times g$ به مدت 20 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. رسوب پلاکتی به دست آمده در بافر تاپرود (140 میلی مولار NaCl ، 3 میلی مولار KCl ، 12 میلی مولار NaHCO_3 ، 0 میلی مولار NaH_2PO_4 ، 1 میلی مولار CaCl_2 ، 1 میلی مولار MgCl_2 و pH 7.4) با غلظت 5×10^9 عدد پلاکت در هر میلی لیتر سوسپانسیه شد.

دستور کیت انکوبه گردیدند. آنتی بادی اولیه مورد نظر (آنتی ERK1/2, anti ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti p38, anti-phospho-JNK or anti JNK) رقیق شده در بلو کینگ بافر به چاهک‌ها افزوده شد. چاهک‌ها با بافر فسفات نمکی حاوی توین (PBS-T) سه بار شستشو داده شدند و سپس با آنتی بادی ثانویه رقیق شده در بلو کینگ بافر، به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند. پس از سه بار شستشوی مجدد، انکوباسیون با کمپلکس استرپتوآویدین-HRP در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه انجام شد. به دنبال سه بار شستشوی مجدد، چاهک‌ها در معرض TMB برای 15 دقیقه قرار گرفتند. پروسه رنگ زایی با اسید سولفوریک 1 مولار متوقف شد. جذب نوری چاهک‌ها در 450 نانومتر و 540 نانومتر برای حذف جذب اضافی پلیت با الیزا ریدر (stat fax) قرائت شد. جذب‌ها در محور y منجی استاندارد در مقابل محور X غلظت‌ها قرار داده شد و غلظت‌های متناظر به دست آمد و در عدد رقت ضرب گردید.

آنالیزهای آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA) انجام شد و تست‌های آماری mann-whitney U و kruskal wallis H برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تمام نتایج به جز نتایج p-سلکتین که مستقیماً ارائه شده، به صورت نسبت درصد شکل فسفریله به توتال ارائه گردیدند این کار جهت نرمالیزه کردن مقادیر در نمونه‌های مختلف انجام شد. ارزش آماری ($p < 0/05$) به عنوان معیار معنی داری انتخاب شد.

یافته‌ها

اثر سلنیوم روی فسفریلاسیون MAPK38

ما شکل فسفریله و توتال P38 را با روش الیزا در حضور و عدم حضور محرک‌های ترومبین یا cu^{2+} oxLDL در لیزیت پلاکتی اندازه گرفتیم. میانگین توتال P38 در هیچ کدام از نمونه‌ها تفاوت معنی دار نشان

400 400 nM نانومول در لیتر SP6000125 (شماره کاتالوگ 8177 cell signaling) و 10 میکرومول در لیتر PD980559 (شماره کاتالوگ 9903 cell signaling) به ترتیب به عنوان مهار کننده‌های ERK و c-JNK، P38 و ERK 1/2 به مدت 2 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد قبل از تحریک با ترومبین و oxLDL انجام گرفت.

آماده سازی لیزیت پلاکتی

پلاکت‌های آماده شده در لیزیت بافر (10 میلی‌مولار تریس، 100 میلی‌مولار NaCl، 1 میلی‌مولار EDTA، 1 میلی‌مولار EGTA، 20 میلی‌مولار Na₄P₂O₇، 1 میلی‌مولار NaF، 0/5 درصد Deoxycholate، 1 درصد تریتون -یکس 100، 1 میلی‌مولار PMSF، 10 درصد گلیسرول، 2 میلی‌مولار Na₃VO و 0/1 درصد SDSpH 7/4) سوسپانسیه شده و در 13000 دور در دقیقه، 4 درجه سانتی‌گراد و به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی برای آنالیزهای الیزا برداشته شد و برای کاهش اثر زمینه‌ای تمام لیزیت‌ها 1:10 رقیق شدند.

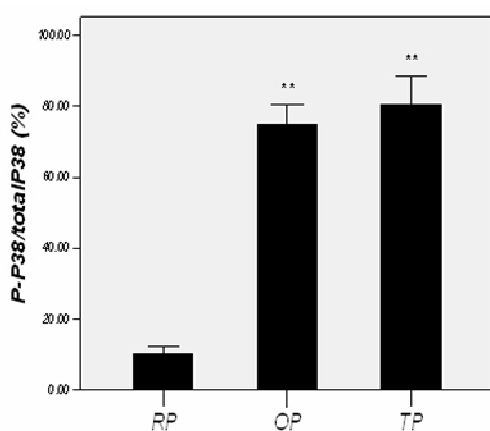
محتوای فسفو - P38 (pThr180/pTyr182) MAPK و توتال P38 MAPK کیت‌های (شماره کاتالوگ CS0020 سیگما) و شماره کاتالوگ PM0100 سیگما) اندازه گیری شدند. هم‌چنین فسفو c-JNK1 & 2 و توتال c-JNK1 & 2 به ترتیب با کیت‌های (شماره کاتالوگ CS0100 و CS0130 سیگما) اندازه گیری شدند. برای تعیین مقدار فسفو ERK1/2 (Thr202/Tyr204) از کیت‌های (شماره CS7177 و CS7050 سیگما) استفاده گردید. مقدار p-سلکتین با استفاده از کیت الیزای شماره RAB0426 سیگما اندازه گیری شد.

آنالیزهای الیزا

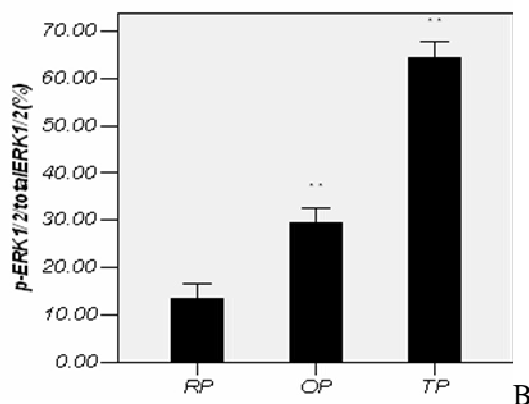
روش‌های اندازه گیری با تکنیک الیزا به طور خلاصه به شرح زیر می‌باشد، ابتدا کیت‌ها با محیط هم شده و نمونه‌ها، استانداردها یا آماده شده و کنترل‌ها به چاهک‌های مربوطه اضافه شده و به مدت لازم و قید شده در

و PT ($69/98 \pm 14/04$) ($p < 0/05$) کاهش داد (شکل B.2). برای مقایسه اثر مهار سلنیوم روی مسیرهای التهابی MAPK از مهارکننده‌های کلاسیک این مسیرها نیز استفاده شد. پیش انکوباسیون با 5 میلی‌مولار در لیتر SB203580 (مهار کننده کیناز P38) به مدت 30 دقیقه سطح P38 فسفریله را در گروه OP به ($12/12 \pm 3/38$) ($p < 0/05$) و در گروه PT به ($10/53 \pm 2/55$) ($p < 0/05$) کاهش داد (شکل A, B).

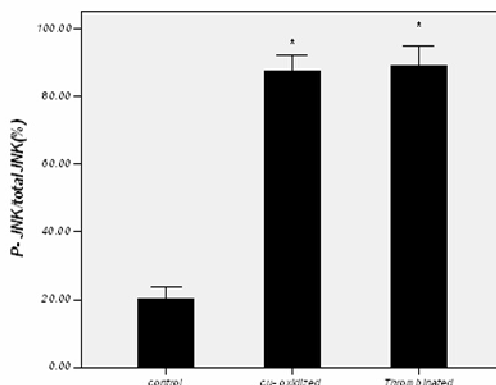
نداد ($p = 0/77$) مجاورت با oxLDL به مدت 10 دقیقه فسفریلاسیون P38 را نسبت به حالت آرمیده ($12/33 \pm 5/04$) بیش از شش برابر افزایش داد ($74/44 \pm 8/73$) ($p < 0/05$) (شکل 1، A). ترومبین فسفریلاسیون P38 را حتی بیشتر از oxLDL القا کرد ($81/52 \pm 8/46$) ($p < 0/05$) (شکل B.1). مجاورت با سلنیوم فسفریلاسیون القا شده را به میزان قابل توجهی در گروه OP ($17/87 \pm 3/93$) ($p < 0/05$)



A



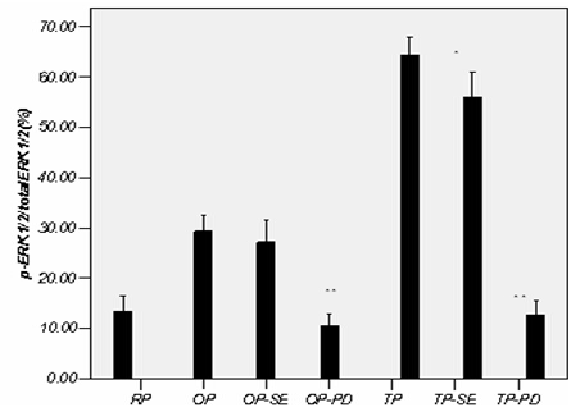
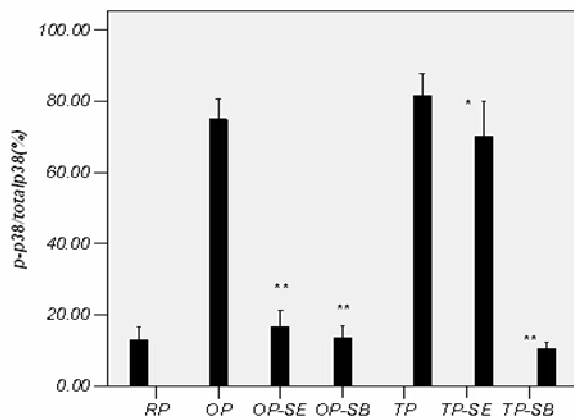
B



C

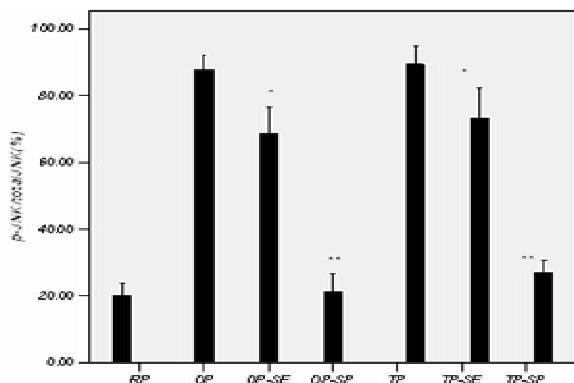
شکل 1. OxLDL و ترومبین فسفریلاسیون p38, c-JNK و ERK1/2 را القا می‌کنند.

پلاکت‌های شسته شده (5×10^9 عدد پلاکت در هر میلی‌لیتر) با 50 میکروگرم در هر میلی‌لیتر ox LDL و 0/5 واحد در میلی‌لیتر ترومبین به مدت 10 دقیقه برای مطالعه فسفو پروتئین‌ها و 24 ساعت برای بیان p-سلکتین انجام شد. محتوای فسفو- P38 و توتال P38، فسفو JNK1&2 و توتال JNK1&2 و فسفو- ERK1/2 و توتال ERK1/2 و نیز p-سلکتین با روش الیزا اندازه‌گیری شد. از نسبت فسفریله به توتال برای نرمالیزه کردن محتوای فسفو پروتئین‌ها استفاده شد. RP: پلاکت‌های آرمیده بدون هیچ انکوباسیون، OP: پلاکت‌های تحریک شده با ox LDL و TP: پلاکت‌های تحریک شده با ترومبین



A

B



C

شکل 2. سلنیوم فسفریلاسیون P38, ERK1/2 و JNK را کاهش می دهد. پیش-انکوباسیون با 5×10^3 نانو مول در هر لیتر SB203580، 400 نانومول در لیتر SP6000125 و 10 میکرو مول در لیتر PD980559 به ترتیب به عنوان مهار کننده‌های P38, JNK و ERK 1/2 به مدت 2 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد قبل از تحریک با ترومبین و oxLDL انجام گرفت. RP: پلاکت‌های آرמידه بدون هیچ انکوباسیون، OP: پلاکت‌های تحریک شده با oxLDL، TP: پلاکت‌های تحریک شده با ترومبین، SB: PD980559، SP: SB203580، PD: SP6000125.

اثر سلنیوم بر روی فسفریلاسیون ERK1/2

در این مطالعه ابتدا اثر تحریک کنندگی oxLDL و ترومبین را بر روی فسفریلاسیون ERK1/2 در پلاکت‌ها مورد بررسی قرار دادیم. برای این کار میزان ERK1/2 فسفریله و توتال در حضور هر دو محرک اندازه‌گیری گردید. ERK1/2 توتال در هیچ کدام از نمونه‌ها با بقیه تفاوت معنی‌دار نداشت ($p=0/92$). حضور 5

واحد ترومبین فسفریلاسیون این پروتئین را چهار تا پنج برابر نسبت به حالت پایه افزایش داد ($64/45 \pm 4/92$) ($p < 0/05$) (شکل 1، B). حضور 50 پیکوگرم در هر میلی‌لیتر oxLDL نیز منجر به افزایش فسفریلاسیون ERK1/2 شد اما این افزایش به مراتب کمتر از اثر ترومبین بود ($29/35 \pm$) ($p < 0/05$) (شکل 1، A).

داد(شکل C.1). حضور سلنیوم به طور معنی‌دار سطح فسفریلاسیون JNK را در گروه OP $\pm 11/08$ (شکل C.2). (p<0/05)(68/39) و TP $\pm 12/43$ (73/20) (p<0/05).

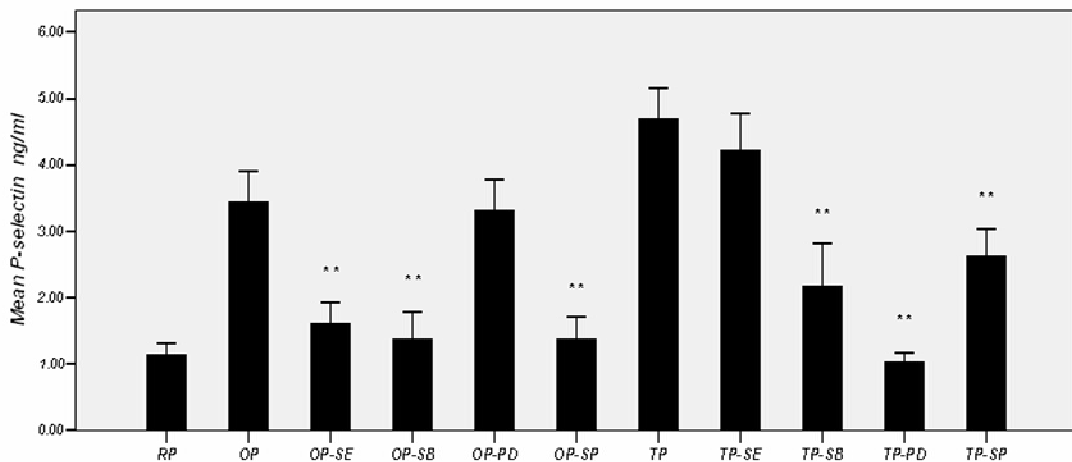
اثر سلنیوم روی بیان P-سلکتین

مقایسه بیان p-سلکتین در گروه RP $\pm 2/58$ و OP $\pm 6/44$ (34/40) (p<0/05) و TP $\pm 6/77$ (11/29) (46/86) (p<0/05) اندازه‌گیری شد(شکل 3). نتایج نشان داد که هر دوی این محرک‌ها قادرند بیان p-سلکتین را در پلاکت‌ها افزایش دهند. در گروه OP حضور سلنیوم بیان این پروتئین القاء شده را کاهش داد $\pm 4/49$ (16) (p<0/05). هم‌چنین کاهش معنی‌دار p-سلکتین در حضور مهارکننده‌های p38 و JNK نیز در گروه OP دیده شد (شکل 3) (p<0/05) اما در حضور مهارکننده ERK1/2 (PD980559) بیان p-سلکتین القا شده با oxLDL کاهش معنی‌دار نشان نداد $\pm 6/77$ (33/01) (p=0/17) (شکل 3).

استفاده از مهارکننده کیناز ERK1/2 یعنی PD980559 قبل از تحریک باعث کاهش فسفو ERK1/2 در TP شد $\pm 6/77$ (33/01) (p<0/01) (شکل B.2). این کاهش در گروه OP نیز معنی‌دار بود $\pm 4/33$ (10/20) (p<0/05) (شکل B.2). در حضور سلنیوم میزان فسفریلاسیون ERK1/2 در گروه TP کاهش معنی‌دار حاشیه‌ای نشان داد $\pm 6/94$ (56/02) (p=0/55) (شکل 2). اما میزان فسفو ERK1/2 القا شده در حضور oxLDL با سلنیوم کاهش معنی‌دار نشان نداد $\pm 6/93$ (25/16) (p=0/07) (شکل B.2).

اثر سلنیوم بر روی فسفریلاسیون JNK

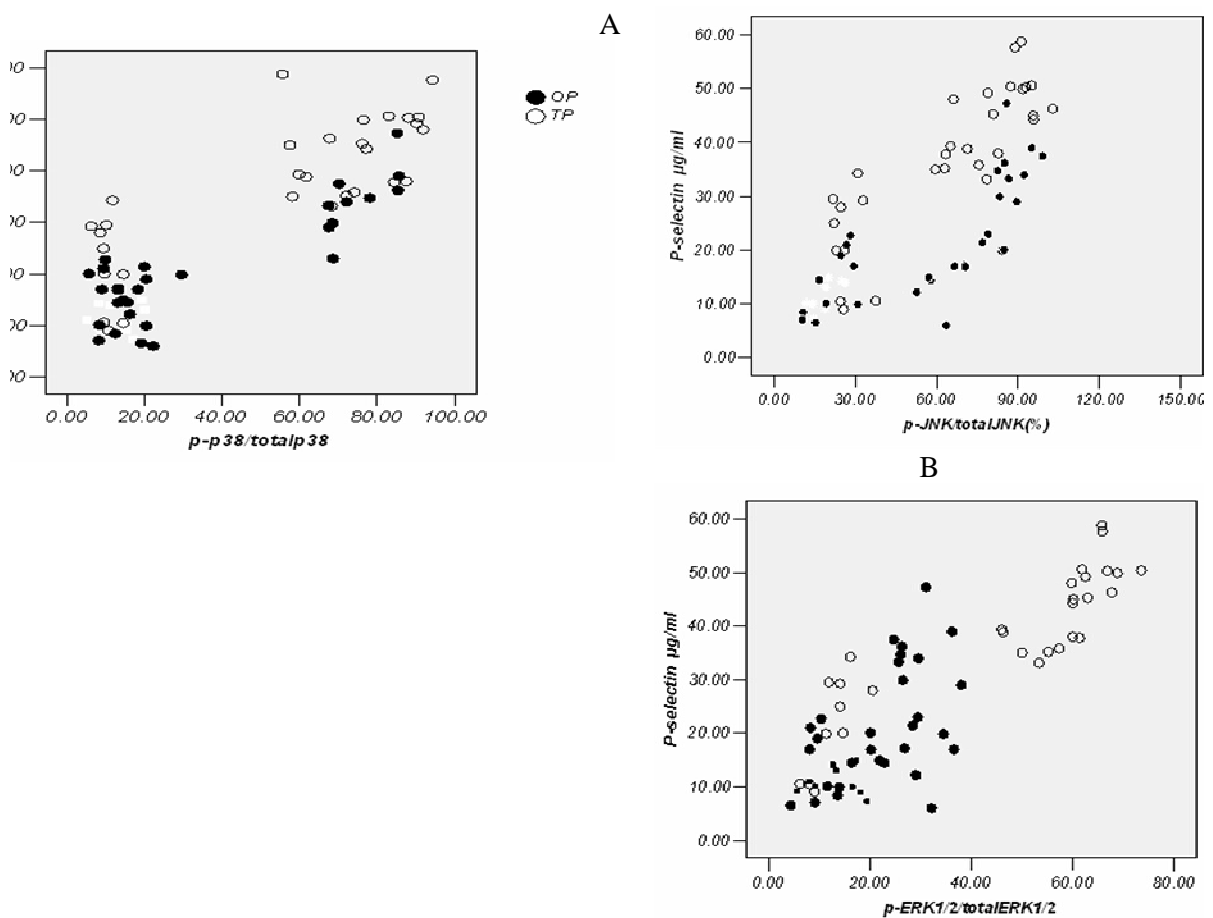
اندازه‌گیری سطح فسفو JNK و توتال JNK بعد از انکوباسیون ده دقیقه‌ای در حضور محرک‌های فوق نشان داد که بیان توتال JNK تفاوت معنی‌داری ندارد (p=0/83). اما فسفریلاسیون این پروتئین در هر دو گروه OP $\pm 6/15$ (87/70) (p<0/05) و TP $\pm 8/03$ (89/27) (p<0/05) نسبت به حالت آرمیده افزایش نشان



شکل 3. مقایسه سطح p-سلکتین پلاکتی در حضور سلنیوم، PD980559, SB203580, SP6000125 در پلاکت‌های تحریک شده با oxLDL یا ترومبین
 RP: پلاکت‌های آرمیده بدون هیچ انکوباسیون، OP: پلاکت‌های تحریک شده با oxLDL، TP: پلاکت‌های تحریک شده با ترومبین ، SB: SB203580، PD: PD980559، SP: SP600015.

(شکل 3). با بررسی همبستگی پیرسون ما متوجه شدیم که در گروه OP یک ارتباط معنی‌دار بین بیان p-Selکتین و فسفریلاسیون P38 وجود دارد ($r=0/65$) ($p < 0/05$) مشابه این ارتباط بین p-Selکتین و فسفریلاسیون JNK دیده شد ($r=0/72$) ($p < 0/05$) اما این رابطه در مورد p-Selکتین و فسفریلاسیون ERK1/2 ضعیف‌تر بود ($r=0/20$) ($p < 0/05$) (شکل 4.A, B, C).

ما همچنین اثر سلنیوم و مهارکننده‌های SP600012 و PD980559, SB203580 را بر روی p-Selکتین القا شده با ترومبین در شکل 3 نشان دادیم. مهارکننده‌های P38 و JNK و ERK1/2 توانستند بیان این پروتئین را به ترتیب تا $(12/62 \pm 4/22)$ ، $(26/10 \pm 5/90)$ و $(10/16 \pm 2/22)$ با معنی‌داری ($p < 0/05$) کاهش دهند اما سلنیوم بیان p-Selکتین القا شده با ترومبین را به طور معنی‌دار کاهش نداد ($42/04 \pm 8/07$) ($p = 0/10$)



شکل 4. ارتباط بین فسفریلاسیون P38, JNK و ERK1/2 و بیان p-Selکتین پلاکتی همبستگی پیرسون در گروه OPA بین بیان p-Selکتین و فسفریلاسیون P38 ($r=0/65$) ($p < 0/05$); B: بین p-Selکتین و فسفریلاسیون JNK ($r=0/72$) ($p < 0/05$) و بین p-Selکتین و فسفریلاسیون ERK1/2 ($r=0/20$) ($p < 0/05$), همبستگی در گروه TP بین بیان p-Selکتین و فسفریلاسیون P38 ($r=0/24$) ($p < 0/05$). بین p-Selکتین و فسفریلاسیون JNK ($r=0/20$) ($p < 0/05$) و بین p-Selکتین و فسفریلاسیون ERK1/2 ($r=0/24$) ($p < 0/05$) : OP: پلاکت‌های تحریک شده با ox LDL و TP: پلاکت‌های تحریک شده با ترومبین

سلکتین القا شده با استرس اکسیداتیو را داشته است (28). البته در این مطالعه از سلول‌های اندوتلیال استفاده گردیده و نیز تنها پروتئین التهابی P38 از بین سه عضو مهم خانواده MAPK ارزیابی شده است. نتایج این مطالعه اثر کاهندگی سلنیوم بر فسفریلاسیون P38 را نیز به خوبی نشان داده است که مطابق با یافته‌های ما می‌باشد.

نتایج حاصل از کار ما نشان دادند که پروتئین‌های التهابی P38 و JNK و ERK1/2 تغییرات مشابهی را در شرایط استرس اکسیداتیو از خود نشان می‌دهند متعاقباً "سلنیوم تراپی کاهش سطح فسفریلاسیون القا شده را در این خانواده نشان می‌دهد به جز پروتئین ERK1/2 که در استرس اکسیداتیو سطح فسفریلاسیون بالاتری نشان داد ولی نتایج اثر سلنیوم در کاهش فسفریلاسیون این پروتئین معنی دار نبود. به نظر می‌رسد پروتئین ERK1/2 کمتر تحت تاثیر سلنیوم واقع می‌شود و مسیر اصلی اثر سلنیوم بیشتر P38 و JNK را درگیر می‌کند. در تائید این مطلب به مطالعه کالکان اوسار و همکارانش نیز می‌توان اشاره کرد که بعد از تست هیپوکسی - اکسیژن رسانی مجدد نشان دادند که سلنیوم به عنوان بخشی از سیستم آنتی اکسیدانی با مسیر پیام رسانی P38 نیز ارتباط دارد (29) به طور مشابه در مجاورت ترومبین نیز هر سه پروتئین التهابی P38، JNK و ERK1/2 سطح فسفریلاسیون بالاتری نشان دادند حتی میزان افزایش فسفریلاسیون ERK1/2 در مقایسه با استرس اکسیداتیو به طور معنی داری بیشتر بود اما هر چند در بررسی اثر سلنیوم بر روی فسفریلاسیون القا شده با ترومبین، بر روی پروتئین‌های P38، JNK کاهش قابل توجه مشاهده شد ولی کاهش ERK1/2 با این که معنی دار بود نسبت به دو پروتئین قبلی چندین بار کمتر بود. یافته جالب این بود که سلنیوم با وجود کاستن قابل توجه فسفریلاسیون P38 و JNK نتوانست بیان p- سلکتین القا شده با ترومبین را کاهش دهد. با توجه به این نتایج، احتمالاً ترومبین از مسیری غیر از مسیر مورد استفاده لیپو پروتئین‌های کم چگال اکسید شده برای تحریک پلاکت‌ها استفاده می‌کند این فرضیه در مطالعات قبلی نشان داده شده و این مطالعات NF-Kb را به

در گروه TP ارتباط بین بیان p- سلکتینو فسفریلاسیون P38 معنی‌دار بود ($r=0/75$) ($p<0/05$). مشابه این ارتباط بین p- سلکتینو فسفریلاسیون JNK دیده شد ($r=0/20$) ($p<0/05$) اما این رابطه در مورد p- سلکتینو فسفریلاسیون ERK1/2 ضعیف‌تر بود ($r=0/24$) ($p<0/05$) (شکل 4.A,B,C).

بحث

یافته‌ها در این مطالعه نشان دادند که سطح بیان p- سلکتین به عنوان مارکر التهابی در شرایط استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد نیز افزایش فسفریلاسیون P38، JNK و ERK1/2 در مجاورت لیپوپروتئین‌های اکسید شده موید این واقعیت است که در استرس اکسیداتیو فعال سازی پلاکت‌ها با فسفریلاسیون مسیرهای التهابی کلاسیک در ارتباط است از طرفی مطالعات اخیر در رابطه با سلنیوم نشان دهنده این است که سلنیوم در بسیاری از بیماری‌ها مانند آترواسکلروز، برخی سرطان‌ها و متاستاز اثرات مثبت بهبود از خود نشان می‌دهد که باعث کاهش بیان p- سلکتین پلاکتی و اندوتلیالی می‌شود (14). p- سلکتین یک پروتئین چسبندگی سلولی بسیار شناخته شده می‌باشد که در اثر تحریک مسیرهای التهابی MAPK به شدت القا می‌شود (24). مطالعات زیادی ثابت کرده‌اند که واسطه کلیدی در ضایعات هموراژیک به دنبال آزاد شدن سیتوکین‌های التهابی مانند فاکتور تومور نکروز α -TNF و اینترلوکین β -1 (IL) همین مولکول می‌باشد (25). ماسپست نشان داد که در افراد سالم میزان ترشح این پروتئین در پلاسما از 40 نانو گرم در هر میلی‌لیتر کمتر می‌باشد (21). در مطالعه چن و همکارانش اگرچه هر دو محرک موجب افزایش بیان p- سلکتین در پلاکت‌ها شدند اما اثر تحریکی ترومبین بیشتر بود که مطابق با مطالعه ما می‌باشد (26). البته اثر هم افزایی این دو محرک (استرس اکسیداتیو و ترومبین) در بیان p- سلکتین توسط سیندروا گزارش شده است (27) که با توجه به افزایش هر دو محرک در آترواسکلروز قابل تامل است. مطابق با نتایج ما در مطالعه یادآور سلنیوم اثر کاهندگی بر روی بیان p-

2. Daub K, Lindemann S, Langer H, Seizer P, Stellos K, Siegel-Axel D, et al. The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2007;33(2):173-8. Epub 2007/03/07.
3. Olas B, Wachowicz B. Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets*. 2007;18(8):555-65. Epub 2007/09/14.
4. Karimi P, Rashtchizadeh N. Oxidative Versus Thrombotic Stimulation of Platelets Differentially activates Signalling Pathways. *Journal of cardiovascular and thoracic research*. 2013;5(2):61-5. Epub 2013/11/20.
5. Stellos K, Sauter R, Fahrleitner M, Grimm J, Stakos D, Emschermann F, et al. Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(8):2017-20. Epub 2012/06/16.
6. Volf I, Roth A, Moeslinger T, Cooper J, Schmid W, Zehetgruber M, et al. Stimulating effect of biologically modified low density lipoproteins on ADP-induced aggregation of washed platelets persists in absence of specific binding. *Thrombosis research*. 2000;97(6):441-9. Epub 2000/03/08.
7. Choe E, Min DB. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2006;46(1):1-22. Epub 2006/01/13.
8. Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circulation research*. 2008;102(12):1512-9. Epub 2008/05/24.
9. Tonon G, Luo X, Greco NJ, Chen W, Shi Y, Jamieson GA. Weak platelet agonists and U46619 induce apoptosis-like events in platelets, in the absence of phosphatidylserine exposure. *Thrombosis*

عنوان مدياتور اصلی تحریک ترومبینی می‌شناسند که به دنبال فعال شدن گیرنده فعال شونده با پروتاز (PAR1,4) فعال شده و اثرات خود را اعمال می‌کند (30) مقایسه اثر سلنیوم با مهار کننده‌های کلاسیک خانواده MAPK در التهاب القا شده با استرس اکسیداتیو الگوی مشابهی را نشان می‌دهد که فرضیه اثر سلنیوم بر خانواده MAPK را به شدت تأیید می‌کند. این مشابهت در مطالعه رگس و همکارانش بر روی سلول‌های اندوتلیال نیز مشاهده شده است (14).

نتیجه گیری

در این مطالعه بیش از پیش اثر سلنیوم تراپی بر کاهش التهاب القا شده در شرایط استرس اکسیداتیو نشان داده شد و از آنجائی که اثرات سلنیوم بسیار شبیه اثرات مهار کننده‌های کلاسیک مسیره‌های التهابی MAPK بود نه تنها می‌شود از سلنیوم به عنوان مکمل سیستم آنتی اکسیدانی استفاده کرد بلکه اثرات ضد التهابی آن بر روی پلاکت‌ها نیز باید مورد توجه قرار گیرد با توجه به این که پلاکت‌ها به عنوان سلول‌های بدون هسته در گردش هدف بسیاری از داروهای قلبی عروقی هستند و مسیر MAPK یک مسیر مهم التهابی است احتمالاً می‌توان از سلنیوم به عنوان یک مکمل ضد التهاب نیز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی با عنوان "بررسی مکانیسم اثر سلنیوم در کاهش بیان P-سلکتین" مصوب کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد.

منابع

1. Riccioni G, Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *Journal of geriatric cardiology : JGC*. 2012;9(3):305-17. Epub 2012/10/26.

17. Trumbo PR. The level of evidence for permitting a qualified health claim: FDA's review of the evidence for selenium and cancer and vitamin E and heart disease. *The Journal of nutrition*. 2005;135(2):354-6. Epub 2005/01/27.
18. Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Den Hond E, Thijs L, Fagard RH, et al. Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. *European heart journal*. 2007;28(5):628-33. Epub 2007/01/24.
19. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(4):762-73. Epub 2006/10/07.
20. Wei WQ, Abnet CC, Qiao YL, Dawsey SM, Dong ZW, Sun XD, et al. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(1):80-5. Epub 2003/12/20.
21. Masopust J, Maly R, Andrys C, Valis M, Bazant J, Hosak L. Markers of thrombogenesis are activated in unmedicated patients with acute psychosis: a matched case control study. *BMC psychiatry*. 2011;11:2. Epub 2011/01/05.
22. Brigelius-Flohe R, Banning A, Kny M, Bol GF. Redox events in interleukin-1 signaling. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004;423(1):66-73. Epub 2004/03/03.
23. Chan CP, Chang MC, Wang YJ, Chen LI, Tsai YL, Lee JJ, et al. Thrombin activates Ras-CREB/ATF-1 signaling and stimulates c-fos, c-jun, and c-myc expression in human gingival fibroblasts. *Journal of periodontology*. 2008;79(7):1248-54. Epub 2008/07/04.
24. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends in cardiovascular medicine*. 2001;11(3-4):93-102. Epub 2001/11/01.
25. Li YB, Han JY, Jiang W, Wang J. Selenium inhibits high glucose-induced research. 2002;107(6):345-50. Epub 2003/02/05.
10. Pabinger I, Ay C. Biomarkers and venous thromboembolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(3):332-6. Epub 2009/02/21.
11. Kim SH, Johnson VJ, Shin TY, Sharma RP. Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-kappaB signaling pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(2):203-13. Epub 2004/01/22.
12. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(2):254-67. Epub 2005/01/27.
13. Blair P, Rex S, Vitseva O, Beaulieu L, Tanriverdi K, Chakrabarti S, et al. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circulation research*. 2009;104(3):346-54. Epub 2008/12/25.
14. Rex S, Beaulieu LM, Perlman DH, Vitseva O, Blair PS, McComb ME, et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(1):97-110. Epub 2009/07/03.
15. Song S, Freedman J, Mody M, Lazarus AH. Porcine von Willebrand factor and thrombin induce the activation of c-Jun amino-terminal kinase (JNK/SAPK) whereas only thrombin induces activation of extracellular signal-related kinase 2 (ERK2) in human platelets. *British journal of haematology*. 2000;109(4):851-6. Epub 2000/08/06.
16. de Lorgeril M, Salen P. Selenium and antioxidant defenses as major mediators in the development of chronic heart failure. *Heart failure reviews*. 2006;11(1):13-7. Epub 2006/07/05.

28. Duntas LH. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2009;41(6):443-7. Epub 2009/05/07.
29. Kalkan Ucar S, Coker M, Sozmen E, Goksen Simsek D, Darcan S. An association among iron, copper, zinc, and selenium, and antioxidative status in dyslipidemic pediatric patients with glycogen storage disease types IA and III. *J Trace Elem Med Biol*. 2010;24(1):42-5. Epub 2010/02/04.
30. Kawanami D, Matoba K, Kanazawa Y, Ishizawa S, Yokota T, Utsunomiya K. Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF-kappaB signaling pathway activation in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;411(4):798-803. Epub 2011/07/27.
- cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells. *Molecular biology reports*. 2011;38(4):2301-6. Epub 2010/11/06.
26. Chen WF, Lee JJ, Chang CC, Lin KH, Wang SH, Sheu JR. Platelet protease-activated receptor (PAR)4, but not PAR1, associated with neutral sphingomyelinase responsible for thrombin-stimulated ceramide-NF-kappaB signaling in human platelets. *Haematologica*. 2013;98(5):793-801. Epub 2012/10/16.
27. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *The American journal of pathology*. 2007;170(5):1511-20. Epub 2007/04/26.