------مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد3، خاص بالكيمياء، ص12-19، 2005------

دراسة البروتين المرتبط بالسيلينيوم داخل خلايا الدم الحمر

ذكرى علي علوش — *قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الموصل*

نوفل عبد الواحد الطالب — *قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل*

سعد غانم صالح — *قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل*

(تاريخ الاستلام 2001/4/10 ، تاريخ القبول 2001/11/19)

الملخص

ظهر من اضافة السيلينيوم الى دم الانسان، انه يمتص خلال الدقائق الاولى من اضـافته بوسـاطة خلايا الدم الحمر ثم يتحرر القسم الاعظم منه الى البلازما. وقد استخدمت تقنية كروماتوغرافيا الترشـيح الهلامي على عمود الفصل الحاوي على هلام (Sephadex G-75) لفصل البروتين المرتبط بالـسيلينيوم داخل خلايا الدم الحمر وتبين ظهور قمة بروتينية واحدة للنموذج المعامل بالسيلينيوم لمـدة (5, 30 min) وكذلك للنموذج غير المعامل بالسيلينيوم وكان اعلى تركيز للسيلينيوم في الحزمـة البروتينيـة المعاملـة بالسيلينيوم لمدة (5 min) بينما كانت الحزمة البروتينية المعاملة بالـسيلينيوم لمـدة (30 min) ذات وزن جزيئي اعلى. وتدل النتائج على ارتباط السيلينيوم مع بروتينات داخل خلايا الدم الحمـر وتحـرره الـى البلازما مع بقاء بروتينات مرتبطة مع السيلينيوم في داخل خلايا الدم الحمر.

Study of Selenium Binding Protein Inside Erythrocytes

Thikra A. Al-Allwsh — *Department of Chemistry, College of Science, Mosul University*

Nawfal A. Al-Talib — *Department of Chemistry, College of Science, Mosul University*

Saad G. Salih — *Department of Biology, College of Science, Mosul University*

ABSTRACT

When selenium is added to human blood in vitro it is taken up by the erythrocytes in the first minutes and then most of which is released into the plasma.

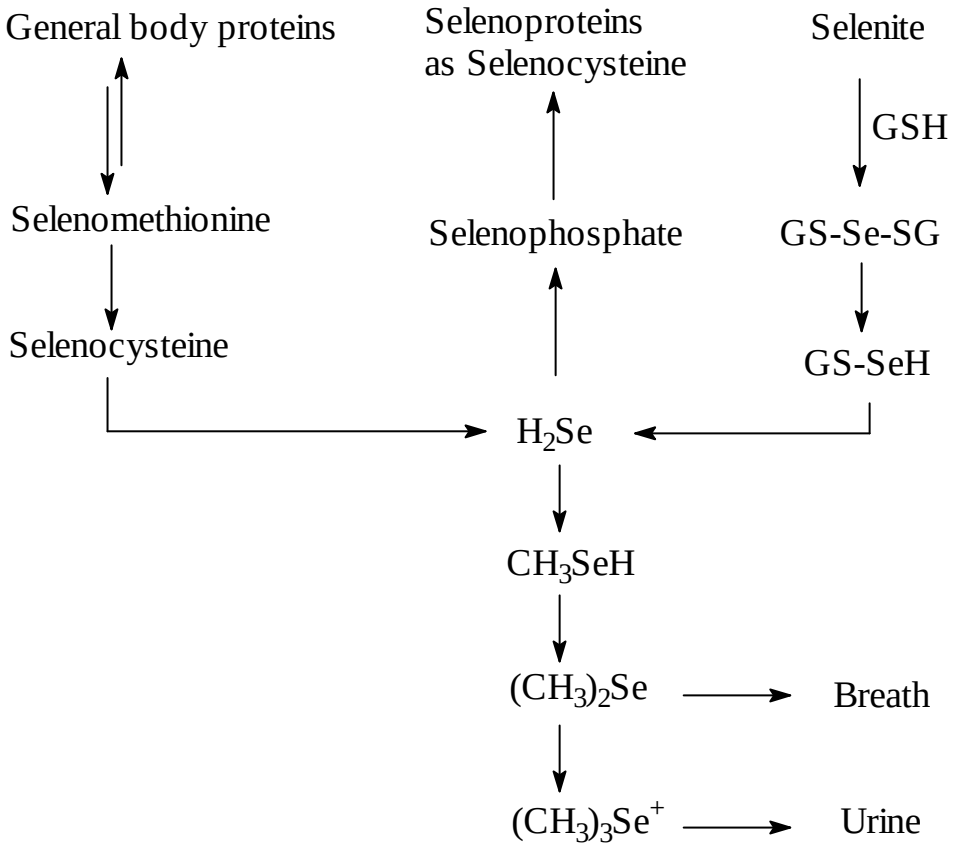
By using the technique of gel filtration chromatography (Sephadex G-75) for separating the selenium binding protein inside erythrocytes, it was found one protein peak for sample treated with selenium for (5, 30 min) and sample without selenium. It is clear that maximum concentration of selenium was found in protein peak treated with

selenium for (5 min), while protein peak treated with selenium for (30 min) showed a higher molecular weight.

The results demonstrate the binding of selenium with protein inside erythrocytes and its release into the plasma leaving the selenium binding protein.

المقدمة

ازداد الاهتمام في السنوات الاخيرة بدراسة العمليات الايضية للسيلينيوم داخل جسم الانسان ولـذلك لأهميته الحيوية وعلاقته مع العديد من الامراض التي تصيب الانسان والحيـوان ويوضـح (Ip, 1998) المسار الايضي للسيلينيوم في المخطط التالي:



يرتبط السيلينيوم بالبروتينات اذ يدخل الى جميع انسجة الجسم عـن طريـق بروتينـات البلازمـا (Marchante *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1969) وقد بين (Marchante *et al.*, 1996) ان (95%) من السيلينيوم الكلي يكون مرتبطا ببروتينات ذات اوزان جزيئية عالية في مصل الدم ويرتبط ايضا مـع البروتينات الدهنية.

واوضح (Tietz, 1986; Burk, 1974) ان السيلينيوم يمتص بوساطة خلايا الدم الحمر ثم يـرتبط اوليا ببروتينات البلازما اذ وجد (Allwsh, 2000; Sandholm, 1975; Lee *et al*., 1969) ان (50- 70 %) منه يمتص خلال (1-2 min) عند اضافة Na_2SeO_3 الى دم انـسان (in vitro) ثـم يـرتبط ببروتينات البلازما بعد (15-20 min) وينتقل بوساطتها الى الانسجة الاخـرى وقـد وجـد (Allwsh, 2000) ان السيلينيوم يرتبط مع الالبومين في حالة وجود وعدم وجود خلايا الدم.

ذكر (Marchante *et al*., 1996) ان هناك ثلاث بروتينات رئيسية مرتبطة بالسيلينيوم وهي انزيم الكلوتاثيون بيروكسيديز والالبومين و Selenoprotein P ، وبين (Flohe *et al*., 2000; Steinert *et al*., 1997) ان هنـاك انـواع عديـدة مـن Selenoprotein P اذ وجـد (Moschos, 2000) Selenoprotein مرتبط مع الهيبارين ومع غشاء الخلية، وبين (Flohe *et al*., 2000; Marchante *et al*., 1996) ان Selenoprotein له دور مهم في حماية الخلية من الاكسدة في حين بين (Wu *et al*., 1995) ان دراسة البروتين المرتبط بالسيلينيوم يمكن ان تفسر آلية تثبيط الخلايـا الـسرطانية بوسـاطة السيلينيوم اذ وجد (Moerk *et al*., 1998). ان Selenoprotein المعوي له دوراً في مقاومة سرطان القولون اذ يستخدم في حمايـة وتمـايز الخلايـا المعويـة كمـا بـين (Flohe *et al*., 2000) اهميـة Selenoprotein في منع الاصابة بالسرطان وذكر (Maiorino *et al*., 1999) انه لايوجـد تكـاثر بدون Selenoprotein.

وجاءت هذه الدراسة لايضاح دور خلايا الدم الحمر في تكوين البروتين المرتبط بالسيلينيوم وهـي دراسة تكميلية لما اوجده (Allwsh, 2000) لمصل وبلازما الدم.

الجزء العملي

النماذج المستخدمة:

استخدم الدم الكامل (Whole blood) للانسان من مجموعة (O^+) وجمع في انابيب تحتوي علـى EDTA.

طرائق العمل:

1- البروتين المرتبط بالسيلينيوم:

اتبعت طريقة (Sandholm, 1975; Lee *et al*., 1969) باضافة محلـول الـسيلينيوم (صـوديوم سلينيت 400 µg/ml) الى الدم (invitro) بنسبة (1:1) وفي درجة حرارة (37 °C) ولفتـرات زمنيـة مختلفة (5-60 min)، ثم فصلت خلايا الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة (4000g لمـدة 10 min) وحللت باضافة الماء المقطر اليها، بعدها تم تقليص الحجم بوساطة جهاز التجفيد (Lyophilizer). ثم قدر تركيز البروتين و السيلينيوم في العينة.

2- تحضير محلول الكفء:

حضر بالخطوات السابقة نفسها مع اضافة الماء المقطر بدلا عن محلول السيلينيوم.

3- تجزئة البروتين الكلي:

تم تجزئة البروتين الكلي الناتج باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Gel-Filtration Chromatography) باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (113 x 2 cm) والحاوي على الهلام من نوع (Sephadex G-75) وباستخدام الماء المقطر كمحلول روغان.

4- تقدير تركيز البروتين :

استخدمت طريقة لاوري المحورة لتقدير تركيز البروتين (Schacterle & Pollack, 1973).

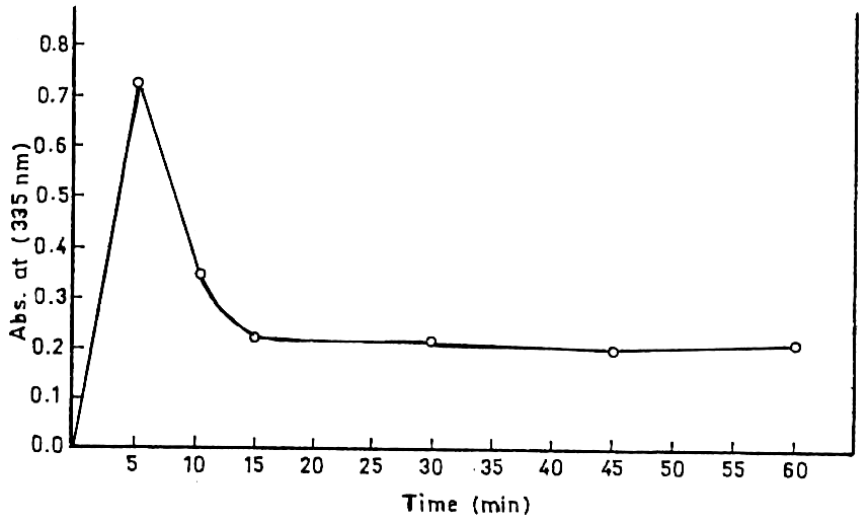
5- تقدير تركيز السيلينيوم :

استخدمت طريقة (Allwsh, 2000) المحورة باستخدام كاشف اورثو-فنيلين ثنائي الامين الذي يكون معقد مع السيلينيوم يستخلص في الطبقة العضوية وله امتصاص عند طول موجي (335 nm).

النتائج والمناقشة

*** تأثير الزمن:**

بينت نتائج تقدير تركيز السيلينيوم في متحال خلايا الدم الحمر بعد اضافة محلول صوديوم سلينيت الى دم الانسان باوقات مختلفة ان اعلى تركيز ظهر له في خلايا الدم الحمر بعد (5 min) ثم بدأ بالانخفاض بعد(10 min) وكما موضح في الشكل (1) وحافظ على تركيزه فيها الى حد (60 min) وهذا يتفق مع مابينه (Sandholm, 1975; Lee *et al.*, 1969) من ان السيلينيوم يمتص بوساطة خلايا الدم الحمر بعد (1-2 min) من اضافته ثم يظهر مرتبطا مع بروتينات البلازما بعد (15-20 min) فيقل تركيزه في خلايا الدم الحمر بينما يزداد في بلازما الدم وهذا ماأكده (Al-Allswh, 2000) من ارتباط السيلينيوم مع بروتينات البلازما بعد(15 min) من اضافته الى الدم.



الشكل 1: تاثير الزمن على ارتباط السيلينيوم بخلايا الدم الحمر.

*** فصل البروتين المرتبط بالسيلينيوم من متحال خلايا الدم الحمر:**

استخدمت طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود الفصل ذي الابعاد (113 x 2 cm) والحاوي على الهلام من نوع (Sephadex G-75) على ارتفاع (107 cm) لفصل المركبات البروتينية المرتبطة بالسيلينيوم في خلايا الدم الحمر.

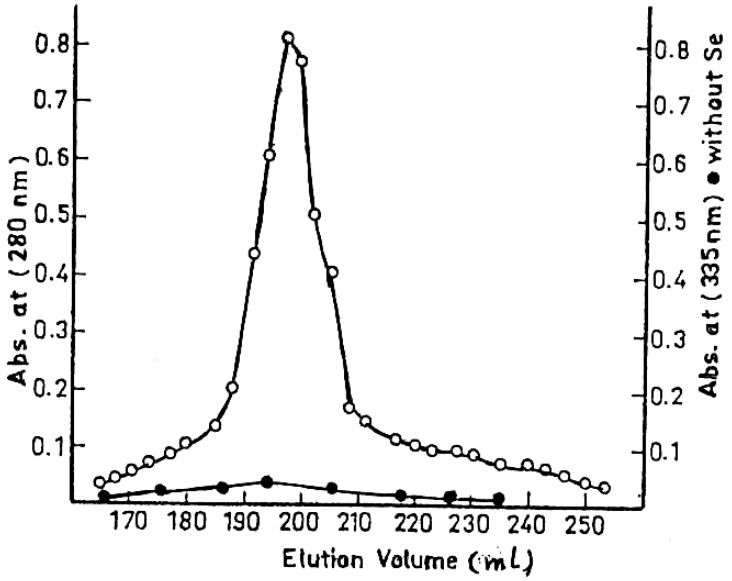
ولوحظ ان النموذج غير المعامل بالسيلينيوم (محلول الكفء) اظهر قمة بروتينية واحدة عند حجم الروغان (197 ml) وكما موضح في الشكل (2)، كذلك اظهر النموذج المعامل بالسيلينيوم لمدة (5 min) و (30 min) قمة بروتينية واحدة ايضا ولكن عند حجم روغان (195 ml) و (186 ml) على التوالي وكما مبينة في الشكلين (3) و (4).

ومن متابعة تركيز السيلينيوم لهذه القمم البروتينية، تبين ان القمة البروتينية المعاملة بالسيلينيوم لمدة (5 min) (الشكل 3) تحتوي على أعلى تركيز للسيلينيوم ثم القمة البروتينية المعاملة بالسيلينيوم لمدة (30 min) (شكل 4) مقارنة مع القمة البروتينية غير المعاملة بالسيلينيوم (الشكل 2).

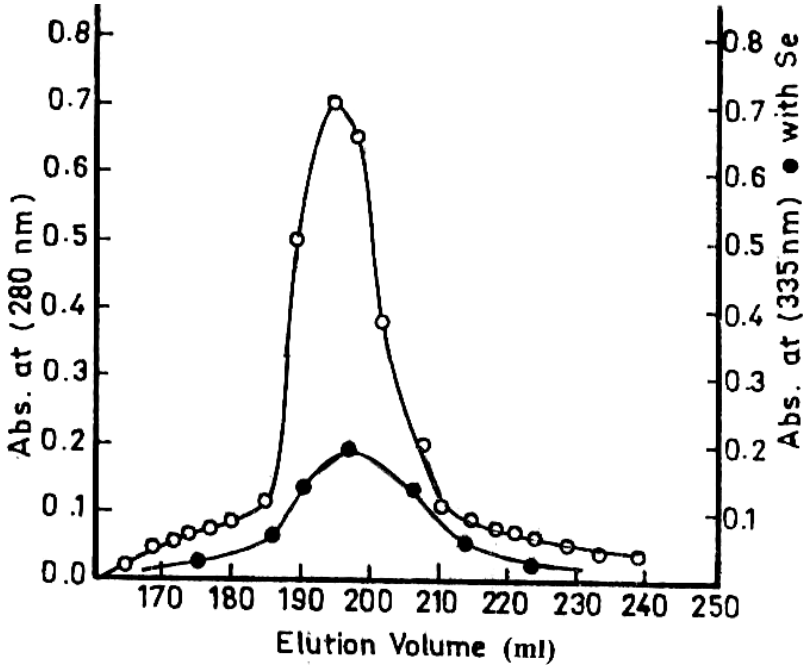
كما لوحظ ان القمة البروتينية المعاملة بالسيلينيوم لمدة (30 min) ظهرت عند حجم روغان اقل (186 ml) مقارنة مع القمتين الاخريتين مما يدل على انها ذات وزن جزيئي اعلى اذ ربما ربط السيلينيوم بين بروتينين أو بيبتيد متعدد مع بروتين في داخل خلايا الدم الحمر وقد بين (Lee *et al.*, 1969) ارتباط السيلينيوم مع الهيموكلوبين او مع بروتينات او بيبتيد متعدد تحتوي الحامض الامينيسيستين كما اوضح (Flohe *et al.*, 2000; Steinert *et al.*, 1997) ارتباط السيلينيوم مع كلوتاثيون بيروكسيديز السايتوسول ومع مركبات اخرى، وذكر(Marchante *et al.*, 1996) ارتباط السيلينيوم مع برتينات ذات اوزان جزيئية عالية او مع البروتينات الدهنية.

وتتفق هذه النتائج مع مابينه (Allwsh, 2000) وتوضح دور خلايا الدم في تكوين البروتينات المرتبطة بالسيلينيوم، اذ تبين انه عند اضافة السيلينيوم الى الدم (invitro) يمتص بوساطة خلايا الدم الحمر خلال الدقائق الاولى من اضافته ويرتبط مع الكلوتاثيون في غشاء الخلية فيكون على شكل (GS-Se-SG)

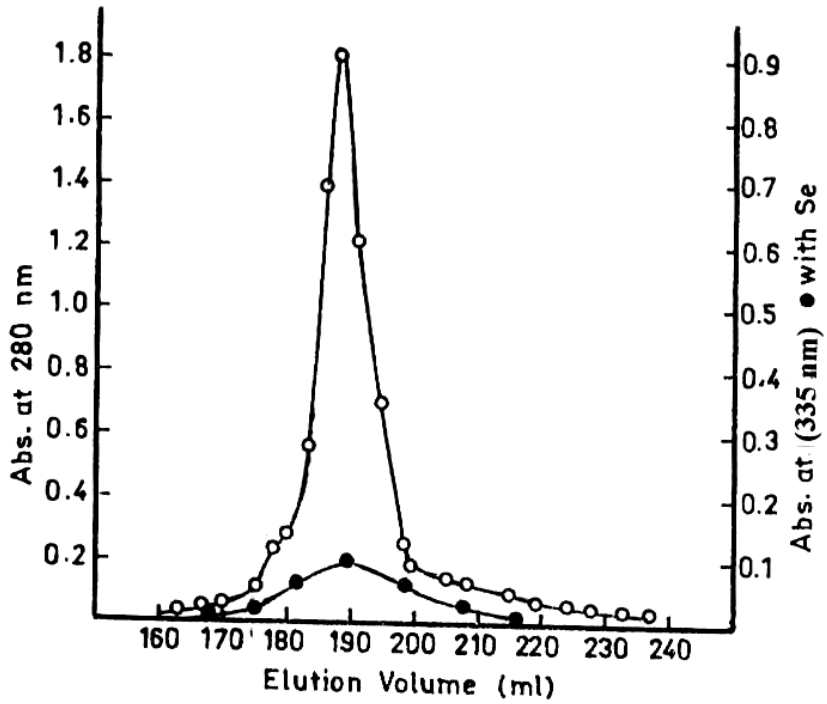
(Sandholm, 1975; Lee *et al.*, 1969) بعدها يتأكسد السلينيت الى H_2Se وهو الشكل الفعال للسيلينيوم اذ يرتبط مع البروتينات في داخل الخلايا ويكون على شكل (P-Se-P) او يدخل بين مجاميع الكبريت في الجسر الكبريتي ويكون على شكل (P-S-Se-S-P) او مع السيستين للبروتين ويتحرر قسم من هذه البروتينات الى البلازما بعد (15-20 min) مرتبطاً مع السيلينيوم مع بقاء قسم من السيلينيوم مرتبط مع بروتينات او بيبتيد متعدد في داخل الخلايا وقد ذكر (Flohe *et al.*, 2000) وجود Selenoproteins داخل الخلايا، اما البروتينات المرتبطة بالسيلينيوم المتحررة الى البلازما فهي الالبومين (Allwsh, 2000; Flohe *et al.*, 2000; Whanger *et al.*, 1996) ثم يتحول من الالبومين الى بروتينات مختلفة مثل انواع الكلوبيولين(Allwsh, 2000; Sandholm,1975; 1973 a,b).



الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان متحلل خلايا الدم الحمر غير المعاملة بالسيلينيوم لتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (113 x 2 Cm) الحاوي على هلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (107 Cm) وبسرعة جريان (31.2 ml/hr).



الشكل3: المظهر الجانبي لروغان متحلل خلايا الدم الحمر المعاملة بالسيلينيوم لمدة (5 min) لتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (113 x 2 Cm) الحاوي على هلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (107 Cm) وبسرعة جريان (31.2 ml/hr).



الشكل 4: المظهر الجانبي لروغان متحال خلايا الدم الحمر المعاملة بالسيلينيوم لمـدة (30 min) لتقنيـة الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (113 x 2 Cm) الحـاوي علـى هـلام (Sephadex G-75) على ارتفاع (107 Cm) وبسرعة جريان (31.2 ml/hr).

REFERENCES

Allwsh, T.A., 2000. Biochemical study of selenium and its relation with cancer. Ph.D., Thesis, College of Science, University of Mosul.

Burk, R. F. 1974. Invivo Se binding to human plasma protein after administration or ^{75}SeO. Biochem. Biophys. Acta, 372:pp. 255-265.

Flohe, L.; Andreesen, J.; Flohe, R. and Ursini, F., 2000. Selenium, the element of the moon, in life on earth. Iubmb. Life, 49:pp. 411-520.

Ip, C. 1998. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. J. Nutr., 128: pp.1845-1854.

Lee, M.; Dong, A. and Yano, J., 1969. Metabolism of ^{75}Se-Selenite by human whole blood in vitro. Can. J. Biochem. 47: pp.791-797.

Maiorino, M.; Flohe, L.; Rover, A.; Steinert, R. and Ursini, F., 1999. Selenium and reproduction. Bio Factors, 10: pp.251-256.

Marchante, G.J.; Sanchez, U.J. and Sanz, M.A., 1996. Serum and tissue selenium contents related to renal disease and colon cancer determined by E. A. A. S. J. Trace Elem. Med. Biol., 10: pp.229-236.

Moerk, H.; Lex, B.; Scheurlen, M.; Dreher, I. and Jakob, F., 1998. Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins targets for selenium supplementation. Nutr. Cancer, 32(2):pp. 64-70.

Moschos, M.P., 2000. Selenoprotein P., Cell. Mol. Life Sci. 57(13-14): p.1836-1845.

Sandholm, M., 1973a. The initial fate of a trace amount of intravenously administered selenite. Acta Pharm. Et. Toxicol., pp.33: 1-5.

Sandholm, M., 1973b. Metabolism of selenite in cow blood in vitro. Acta Pharm. Et. Toxicol., 33:pp. 6-16.

Sandholm, M., 1975. Function of Erythrocytes in attaching Selenite specific plasma proteins. Acta Pharm. Et. Toxicol. 36: pp.321-327.

Schacterle, G.R. and Pollack, R.L., 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. Anal. Biochem., 51:pp. 654-655.

Steinert, P.; Ahrens, M.; Gross, G. and Flohe, L., 1997. cDNA and deduced polypeptide sequence of a mouse selenoprotein P. Bio Factors 6: pp.311-319.

Tietz, N.W., 1986. Textbook of Clinical Chemistry W. B. Saunders Co., Philadelphia: 992.

Whanger, P.; Vandeland, S.; Park, Y. and Xia, Y., 1996. Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans. Ann. Clin. Lab. Sci., 26(2): pp.99-113.

Wu, L.; McGarry, L.; Lanfear, J. and Harrison, P., 1995. Altered selenium binding protein levels associated with selenium resistance. Carcinogenesis , 16(11): pp.2819-2824.