

Camelus عزل وتنقية بروتين الكازئين من حليب الابل العراقية وتقييم فعاليته ضد انواع من الخلايا السرطانية خارج dromedaries الجسم الحي

محمد قيس العاني

جامعة الانبار – كلية العلوم

الخلاصة:

استهدفت الدراسة الحالية عزل وتنقية بروتين الكازئين من حليب الابل العراقية وتقييم كفاءتها في تثبيط انواع من الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي . تضمنت الدراسة اجراء عزل الكازئين في وسط حامضي pH=4.6 وتنقيته بعمود التبادل الايوني DEAE-Cellulose و عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-200 . ومن اجل تأكيد نقاوة الكازئين المعزول اجريت عملية الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلاميد PAGE ، ولغرض تحديد السلوك المناعي لبروتين الكازئين المنقى جزئيا نفذ اختبار النسخ المناعي Immunoblotting باستخدام تقنية Western blot . ولمعرفة تأثير بروتين الكازئين على المحتوى الدقيق للخلايا السرطانية تم اجراء اختبار (High Screening Content) HSC) باعتماد بروتين الكازئين مادة مثبطة لخلايا السرطان البشري من نوع Human Lung Adenocarcinoma A549 . ولأجل تقييم الكفاءة التثبيطية لبروتين الكازئين ضد انواع من الخلايا السرطانية فقد استعملت اربعة انواع من الخلايا السرطانية هي HePG2 و PC3 و MCF7 و A549 وتم تحديد نسبة بقاء الخلايا حية بطريقة اختبار MTT.

اظهرت النتائج امتلاك بروتين الكازئين المعزول من حليب الابل العراقية بعمود التبادل الايوني DEAE-Cellulose و عمود الترشيح الهلامي Sephadex G200 ثلاثة قمم بروتينية لكل عمود وظهور حزمة مشابهة لبروتين الكازئين القياسي على هلام متعدد اكريلاميد. كما اظهر الكازئين سلوكا مناعيا واضحا بالاعتماد على التركيز في اختبار Western Blot . كذلك اوضحت النتائج امتلاك بروتين الكازئين لفعالية تثبيطية تجاه انواع الخلايا السرطانية قيد الدراسة وكان التناسب عكسيا بين تركيز الكازئين ونسبة بقاء الخلايا السرطانية ، كما امتلك بروتين الكازئين فعالية تثبيطية متباينة تجاه محتوى الخلايا السرطانية ، ويمكن الاستنتاج بان بروتين الكازئين المنقى جزئيا من حليب الابل العراقية يمتلك فعالية تثبيطية ضد انواع الخلايا السرطانية قيد الدراسة خارج الجسم الحي.

كلمات دلالية: كازئين، الابل العراقية، تنقية جزئية، خلايا سرطانية، خارج الجسم الحي .

المقدمة:

0.9% بروتين ويشكل فيه الكازئين نسبة 35% (6) كما يشكل بروتين الكازئين نسبة 87-52% من البروتينات الكلية لحليب الابل وهي اعلى من نسبته في حليب البقر كما ان المحتوى الكلي والنوعي من الاحماض الامينية تكون مختلفة بين كازئين حليب الابل مقارنة بحليب البقر (15) (45). وتنقسم بروتينات حليب الابل الى قسمين رئيسيين هما بروتين الكازئين وبروتينات الشرش وتكون نسبة كل منهما 80 و 20% على التوالي ويمتاز الكازئين بتحويله الى راسب ابيض اللون عند خفض الرقم الهيدروجيني للحليب الى 4.6 (7) .

تزايد اهتمام الباحثين بدراسة اهمية استخدام بروتين الكازئين للاغراض الطبية بعد ان نجح استعماله في علاج كثير من الامراض ، فقد استخدم في تثبيط انواع من الخلايا السرطانية (8) وفي علاج امراض الكلى والكبد (9) وفي علاج التهاب الكبد الفايروسي (نوع 10 C) وفي علاج مرض السكر Diabetes mellitus (11) وفي علاج وتثبيط البكتيريا المسببة لالتهابات اللثة Gingivitis في الانسان (16) كما استخدم لدراسة التأثيرات الوقائية لمكونات حليب الابل ضد التعرض للمواد الكيميائية المختلفة (17) كذلك استعمل كازئين حليب الابل في تنشيط فعالية المركب Cisplatin المستخدم في علاج السرطان ولوحظ امتلاك

الحليب من المواد الغذائية المهمة لحياة الانسان بسبب احتوائه على البروتينات ، الدهون ، اللاكتوز ، الفيتامينات والكلوبولينات المناعية ، وتشكل البروتينات المكون الرئيسي للحليب وتصل نسبتها الى 20% (1) ، وتصنف بروتينات الحليب الى خمسة اصناف اساسية هي الكازئين الذي يشكل المكون البروتيني الرئيس في الحليب ويضم ثلاثة اصناف ثنائية هي α , β , κ Casein ، والنوع الثاني من بروتينات الحليب هو الفا-لاكتالبومين (α -Lactalbumin) والنوع الثالث هو الكلوبولينات المناعية (Immunoglobulines) والنوع الرابع هو بيتا-لاكتوكلوبولين (lactoglobuline - β) والنوع الخامس هو بروتينات الشرش (2) (Whey Proteins)

يعد حليب الابل احد اهم مصادر الغذاء في مناطق العالم المختلفة ويعد انتشار الابل بشكل واسع اهم الاسباب التي جعلت من الحليب غذاء اساسيا للسكان (3) وتبعاً لاحصائية منظمة الاغذية العالمية (FAO) يوجد حوالي 17 مليون رأساً من الابل في العالم متوزعة الى 12.2 مليون رأساً في افريقيا و 4.8 مليون رأساً في اسيا وتنتج الناقة الواحدة خلال فترة الارضاع البالغة 18 شهراً ما مقداره 1800-2700 كغم من الحليب (4) . بدأ الاهتمام بحليب الابل في منتصف الثمانينات من القرن الماضي واستمرت الدراسات البحثية لتحليل مكونات حليب الابل وتنقية وتوصيف اجزائه حتى الوقت الحاضر (5).

يعرف الكازئين بأنه مجموعة من البروتينات المفسفرة (PhosphoPr-teins) التي يمكن ترسيبها من الحليب منزوع الدهن (Skimmed Milk) عند رقم هيدروجيني قدره 4.6 ودرجة حرارة 20 درجة مئوية ، ويعد البروتين الأكثر تركيزاً في حليب اللبائن اذ يحتوي حليب الابقار على بروتين كلي يقدر بـ 3.5% (وزن/وزن) ويشكل الكازئين فيه نسبة 83% بينما يحتوي حليب الانسان على

Corresponding Address:

Mohammed Qais Al-Ani

University Of Anbar-College of Science

Email: mohammedqais1975@yahoo.com

باستعمال عمود Sephadex-G200 بأبعاد 40X 1.5 كخطوة للتريشيج الهلامي للبروتينات المعزولة من حليب الابل وتم موازنة العمود باستعمال المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 0.02 مولاري عند الرقم الهيدروجيني pH مقدار 8.6 وبسرعة جريان مقدارها 0.3 مل/دقيقة وتم متابعة الاجزاء 280 نانومتر (13).

- الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلاميد: تمت خطوات الترحيل الكهربائي للبروتينات التي تم استردادها بعمود التريشيج الهلامي باستعمال الهلام متعدد الاكريلاميد PAGE وتم الفصل باستعمال طريقة المحلول المنظم المستمر على هلام بتركيز 12.5% (14) ازيلت صبغة Coomassie brilliant blue R-250 بعد 24 ساعة باستعمال المحلول المزيل للصبغة المكون من حامض الخليك (7.5%) مع الايثانول (30%) مع ثلاثي كلور حامض الخليك (5%).
- اختبار النسخ المناعي Western Blot لبروتينات كازئين حليب الابل المنفقة جزئياً : نفذت تبعاً لما ورد في (19).

• **التجارب الخلوية:** تضمنت دراسة المحتوى الدقيق للخلايا High Screening Content (HSC) (20) باستخدام الخلايا من نوع Human Lung Adeno- carcinoma - A549 وكذلك اختبار سمية الخلايا Cytotoxicity بطريقة 43-5, 4, 3-diphenyl tetrazolium 5, 2, -2-yl dimethyl thiazol (MTT) باستخدام الخطوط الخلوية (MCF7, A549, PC3, HepG2).

• **تقدير البروتين الكلي:** لغرض تقدير البروتين الكلي في مراحل الدراسة الحالية فقد اعتمدت طريقة (Bradford 29).

• **التحليل الاحصائي:** استخدم البرنامج الاحصائي SPSS الاصدار 15 لاجراء التحليل الاحصائي للنتائج.

النتائج والمناقشة:

التنقية الجزئية لبروتين الكازئين: يوضح الشكل 1 كروماتوغرام التبادل الايوني بعمود DEAE-Cellulose ، ويظهر من الشكل ظهور ثلاث قمم لبروتين الكازئين المعزول من حليب الابل العراقية بلغ تركيز البروتين فيها 0.3 ، 0.8 ، 1.1 ملغم/100 مل على الترتيب ، ويحتوي حليب الابل على كمية من البروتينات تختلف باختلاف طريقة التغذية وكمية الغذاء الذي تتناوله الناقة يوميا فضلا عن وجود علاقة بين تركيز البروتينات في حليب الابل مع كمية الماء المتوفرة للناقة (21) وباستطاعة الناقة التي تتناول كمية كافية من الغذاء والماء ان تضع بحدود 10-15 كغم من الحليب يوميا (22) ويحتوي حليب الابل على كمية من بروتين الكازئين تتراوح بين 1.8-2.8 غم/100 مل من الحليب (23) ، ولقد استخدمت طريقة الفصل باعمدة التبادل الايوني على نطاق واسع من اجل الحصول على اجزاء بروتينية تسهل وتزيد من دقة خطوات الفصل اللاحقة لبروتين الكازئين (24).

بروتين الكازئين لفعالية مضادة للسرطان (18) Anticytotoxin).

نظرا لقلّة الدراسات والبحوث حول استعمال بروتين الكازئين من حليب الابل كمثبط للخلايا السرطانية (36) ، فقد جاءت دراستنا الحالية لتوضيح امكانية عزل وتنقية بروتين الكازئين من حليب الابل العراقية ودراسة فعاليتها ضد انواع من الخلايا السرطانية خصوصا مع شيوع استعمال حليب الابل كمادة علاجية لكثير من الامراض ضمن ما يعرف بالطب البديل.

طرائق العمل:

نفذت جميع خطوات هذه الدراسة في مختبرات جامعة العلوم الماليزية (USM) اثناء الالتحاق ببرنامج تطوير الملاكات التدريسية في الجامعات العراقية الذي ترعاه وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جمهورية العراق .

• **جمع نماذج الحليب:** تم جمع نماذج الحليب من 50 ناقة مرضعة من منطقة الرطبة - محافظة الانبار - غرب العراق بواقع 2 لتر/ناقة وتم نقل الحليب في حاويات معقمة تحت ظروف مبردة لاجراء الاختبارات اللاحقة.

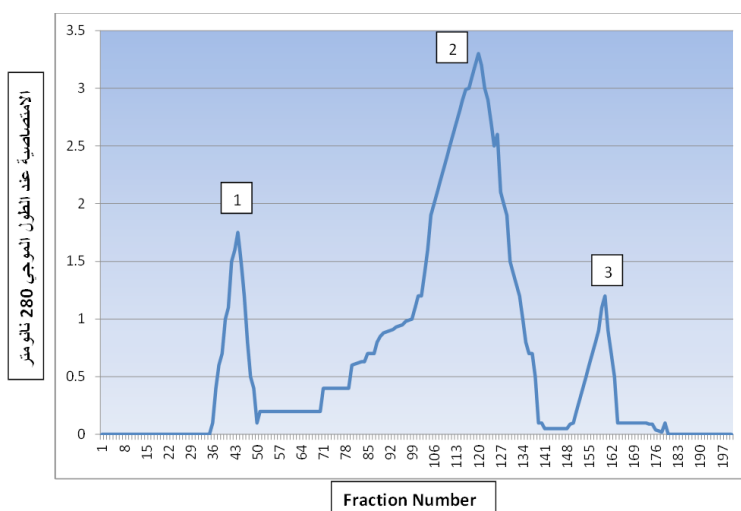
• **ازالة الدهون (Defatting):** تم ازالة الدهون من حليب الابل باستعمال طريقة الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية وازيلت الطبقة العليا للنانوب وتمثل الدهون والمكونات الاخرى ذات الكثافة الواطنة (12).

• **تخصير الكازئين:** تم الحصول على الكازئين بمعاملة الحليب منزوع الدهون مع حامض الهيدروكلوريك ذي رقم هيدروجيني مقداره 4.6 بتركيز 2 مولاري ومن ثم عرض المزيج الى الطرد المركزي الفائق المبرد بسرعة 11000 دورة/دقيقة مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية ، تم الحصول على رقائق الكازئين بشكل راسب ابيض ، غسل الراسب بماء لا ايوني (Deionized) ثلاث مرات ومن ثم اعيد ذوبانه بمعاملة مع محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) بتركيز 1 مولاري عند رقم هيدروجيني مقداره 7.5 ، وفي النهاية حفظ الكازئين بشكل ذائب في الماء المقطر بعدها تم تجفيفه بالتجميد (Lyophilization) وحفظ بالتجميد (20-) درجة مئوية لحين الاستعمال (12).

• **التنقية الجزئية لبروتين الكازئين:**

- **الفصل بعمود التبادل الايوني:** تضمنت التنقية الجزئية لبروتين الكازئين من حليب الابل العراقية اجراء الفصل بعمود التبادل الايوني على المبادل DEAE-Cellulose باستعمال عمود بأبعاد 26 مل X 26 سم ، تمت معادلة العمود باستخدام المحلول المنظم المكون من 10 ملي مولاري من مزيج الايميدازول+ حامض الهيدروكلوريك pH مقداره 7.00 مع 3.3 ملي مولاري من اليوريا و 10 ملي مولاري من Mercaptoethanol.2 ، تم ازالة البروتينات من العمود باستعمال محاليل التدرج الملحي الخطي من ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 0.1-1.0 مولاري وبسرعة جريان 0.3 مل/دقيقة (13).

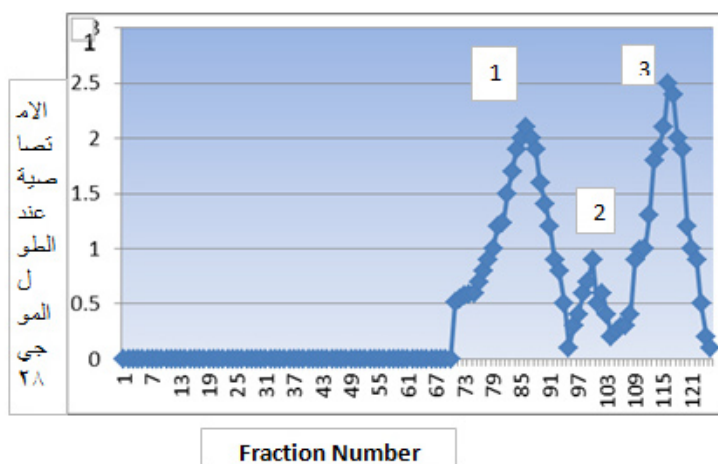
- **التريشيج الهلامي:** اخضعت الاجزاء الناتجة من المبادل الايوني الى الفصل



شكل 1: كروماتوغرام التبادل الايوني لتنقية بروتين الكازئين المعزول من حليب الابل العراقية على عمود (DEAE-Cellulose) باستخدام محلول Imedazol/HCl/Urea/2-Mercaptoethanol ، تم الاسترداد باستخدام التدرج الملحي الخطي لكلوريد الصوديوم بتركيز 0.1-1.0 مولاري في عمود بأبعاد (26X 2.6) سم وبسرعة جريان (0.3 مل/دقيقة) وبواقع (5) مل/جزء.

الحليب يعد من افضل طرق الفصل الحيوي وذلك لدقة وسهولة الحصول على اجزاء بروتينات الحليب مقارنة بطرق الفصل الحيوي الاخرى . تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجده 28 اذ لاحظ وجود اجزاء من بروتينات حليب الابل التي تم فصلها بطريقة الاعمدة تترافق مع وجود العناصر النادرة التي اختلف معها عدد قمم البروتين المفصولة على الاعمدة باختلاف العناصر النادرة الموجودة في نوعية الحليب.

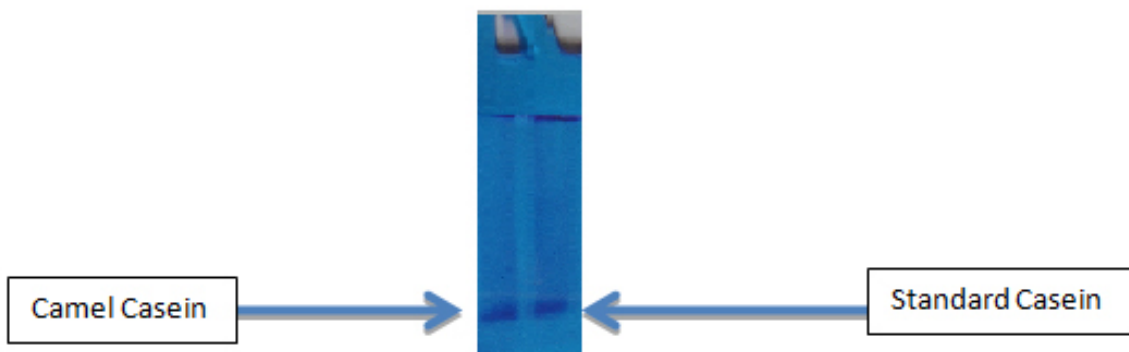
اظهرت نتائج الترشيح الهلامي على هلام Sephadex G-200 لبروتين الكازئين المفصول على عمود التبادل الايوني DEAE-Cellulose امتلاكه ثلاثة قمم بلغ تركيز البروتين الكلي فيها 0.9 ، 0.3 ، 1.4 ملغم/100مل على الترتيب (شكل 2) وتتفق هذه النتيجة مع ما وجده 25 و 26 الذين فسروا وجود اختلافات في تركيب بروتين الكازئين يرجع الى طبيعة الغذاء الذي يتناوله الحيوان و لا يوجد تأثير لفصول السنة على نوعية بروتينات حليب الابل عموماً ، كما بينت دراسة 27 ان استخدام طريقة الترشيح الهلامي لفصل اجزاء بروتينات



شكل 2 : الترشيح الهلامي لبروتين الكازئين المعزول من حليب الابل العراقية باستخدام عمود Sepadex G-200 بابعاد (X 401.5) سم وتمت الموازنة والاسترداد باستخدام المحلول Tris HCl بواقع 5 مل/جزء وبسرعة جريان 0.3 مل/دقيقة

واحدة لبروتين الكازئين على هلام PAG وتم مقارنتها مع بروتين كازئين القياسي ولوحظ التطابق بين الحزمتين كما هو موضح في الصورة رقم 1.

ومن اجل التاكيد من نقاوة الكازئين المفصل على هلام Sephadex G-200 تم اجراء الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلاميد ولوحظ وجود حزمة



صورة 1: الترحيل الكهربائي لبروتين الكازئين المنقى جزئياً على هلام متعدد الاكريلاميد 12% ، صبغ الهلام بصبغة Coomassie Brilliant Blue – R250

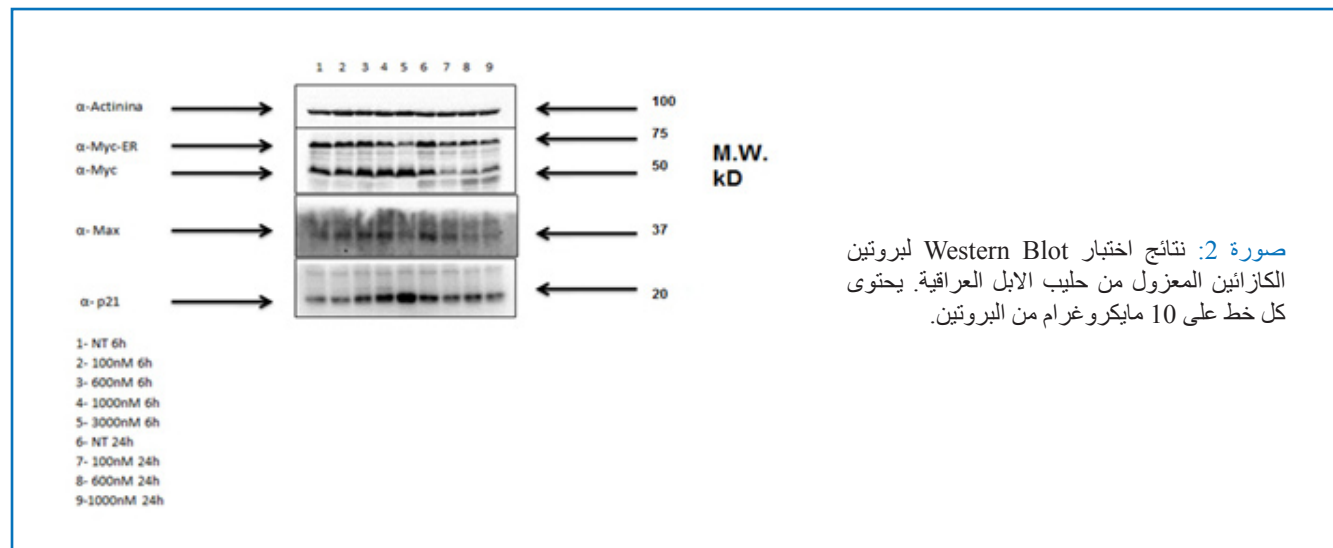
الاكريلاميد يشير بوضوح الى حدوث تجانس كامل لبروتين الكازئين بعد فصله على عمود Sephadex G-200 وان البروتين الناتج من عمود Sephadex G-300 يمكن استخدامه في التجارب الخلوية والمناعية باعتباره على درجة عالية من النقاوة (30) (15) (32).

ان طريقة الترحيل الكهربائي على هلام SDS-PAGE يعد من ابسط الطرق للكشف عن نقاوة بروتين الكازئين بكافة اجزائه (33) ، ان النسبة العالية لبروتين الكازئين في حليب الابل والبالغة 415 ملغم/100مل تجعل من السهولة الحصول على فصل مثالي وجيد عند امراره على اعمدة الفصل الحيوي المختلفة وتكون حزم البروتين واضحة عند اجراء الترحيل الكهربائي على هلام متعدد

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي لفصل مكونات حليب الابل على نطاق واسع (6) (5) (30) (31) من اجل دراسة الاختلافات في مكونات الحليب او لغرض تنقية بروتينات حليب الحيوانات المختلفة او لتقدير الوزن الجزيئي لبروتينات الحليب . ولاحظ (5) ان حزم بروتينات حليب الابل امتازت بانها ذات كثافة جيدة وذات نهايات حادة على هلام متعدد الاكريلاميد ، كما تمكن (6) من الحصول على حزم واضحة لبروتين الكازئين المعزول من حليب الابل عند فصلها كهربائياً على هلام متعدد الاكريلاميد ، كما حصل (31) على نفس السلوك لبروتينات حليب الابل عند ترحيلها على هلام متعدد الاكريلاميد ذي البعدين (2D) ان ظهور حزمة وادة لبروتين الكازئين على هلام متعدد

بين الزمنين والتركيزات المستخدمة في الجزء الخاص ب-actinina α مع وجود علاقة طردية بين الزمنين والتركيزات المستخدمة في الجزء الخاص ب- α -Myc و α -Myc-Er بازدياد التركيزات في المدة الزمنية 6 ساعات وعلى العكس من ذلك في الفترة الزمنية 24 ساعة اذ لوحظ قلة في تركيز نفس الحزمة α -Myc مع زيادة التركيزات وهذا ما لوحظ ايضا في نتيجة كل من α -Max و α -P21 (صورة 2).

الاكريلاميد (34) ، ان الشحنة التي يمتلكها بروتين الكازاين من حليب الابل يكون صفة مميزة له وان نمط الهجرة الكهربائية له يعتمد على الاجزاء الثلاثة التي يمتلكها (35) (36) كما ان هنالك علاقة ضعيفة جدا بين بروتين الكازاين من حليب الابل عند مقارنته مع حليب الانسان (37). اوضحت نتائج النسخ البروتيني المناعي Immunoblotting عند الزمنين 6 و 24 ساعة مقارنة بتركيزات مختلفة من البروتين عدم وجود اختلافات



صورة 2: نتائج اختبار Western Blot لبروتين الكازاين المعزول من حليب الابل العراقية. يحتوي كل خط على 10 مايكروغرام من البروتين.

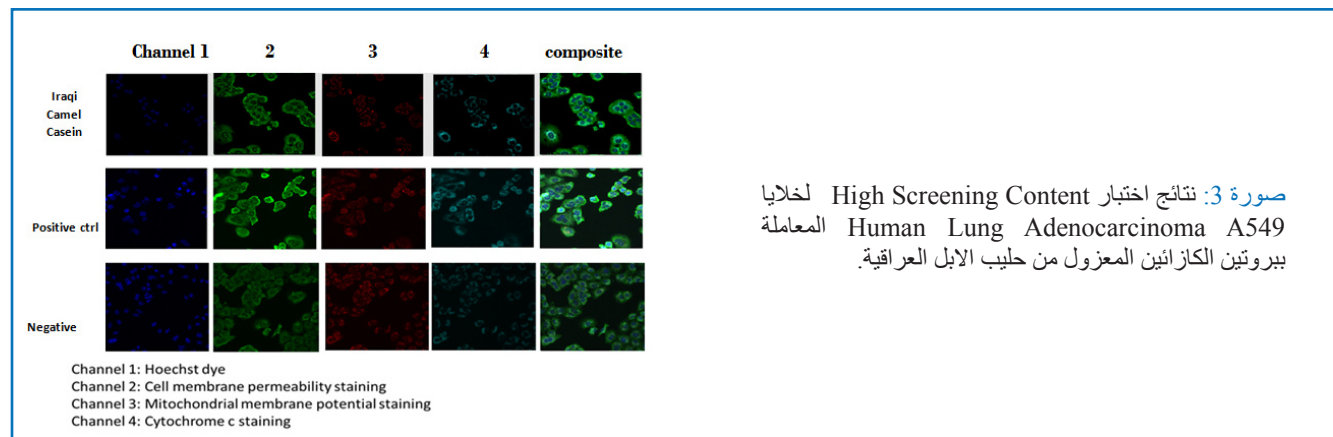
وجود اكثر من خمسين نوعا من البروتينات في حليب الابل عند دراستها بطريقة النسخ المناعي (44).

• السمية الخلوية (Cytotoxicity) لبروتين كازاين حليب الابل العراقية: توضح الصورة 3 نتائج اختبار المحتوى الخلوي الدقيق (High Scree-ing Content HSC) الذي يظهره بروتين الكازاين ضد الاجزاء الخلوية باستعمال مجهر الفلورسنت Fluorescence Microscope وهي من التقنيات الحديثة المستعملة في بحوث علوم الحياة والعلوم الصيدلانية وتستعمل لغرض تحديد القدرة التثبيطية والعلاجية لجزيئات حيوية كالبروتينات والاحماض النووية والبيبتيدات والجزيئات الحيوية الاخرى من خلال تحديد قدرتها على احداث التبدلات المظهرية في الخلايا المدروسة (46) وتشمل التبدلات المظهرية زيادة او نقص في انتاج بروتين معين او ان يكون تغيرا في مظهر وتكوين عضيات خلوية معينة نتيجة معاملتها بمادة حيوية مقترحة (47).

يتضح من الصورة رقم 3 حدوث انخفاض في عدد الخلايا السرطانية المستخدمة من نوع Human Lung Adenocarcinoma A549 مع حدوث تغيرات مظهرية في شكل وحجم المايكوندريا والانوية مع حدوث تنشيط ملحوظ في Cytochrome C بفعل المعاملة ببروتين كازاين حليب الابل العراقية .

تعد بروتينات الحليب عموما من اكثر المواد البايولوجية التي خضعت لدراسات عميقة وفي مختلف انواع الحيوانات (38) ويعتبر بروتين الكازاين هو البروتين المتواجد في جميع انواع الحليب (31) ولوحظ ان الانسان يعاني في كثير من الاحيان من وجود حساسية تجاه حليب البقر بسبب احتوائه على نسبة عالية من البروتين المناعي β -lactoglobulin الذي يسبب التفاعلات المناعية في حين عدم احتواء حليب الام وحليب النوق على هذا البروتين (35) اي ان بروتينات حليب الابل تمتلك صفات مناعية تميزها عن غيرها من بروتينات الحليب في الانواع الاخرى ، كما ان حليب الابل يمتاز بطرز معينة عند اجراء الترحيل الكهربائي على تميزه عن غيره من انواع الحليب الاخرى (5) كما ان فصل بروتين الكازاين من حليب الابل على اعمدة الفصل الحيوي ومنها اعمدة التبادل الايوني اشار الى وجود خمسة اصناف لبروتين الكازاين هي α 1, α 2, β , γ توزعت على اربع قمم Peaks في عمود التبادل الايوني DEAE-Cel- (lulose 39)

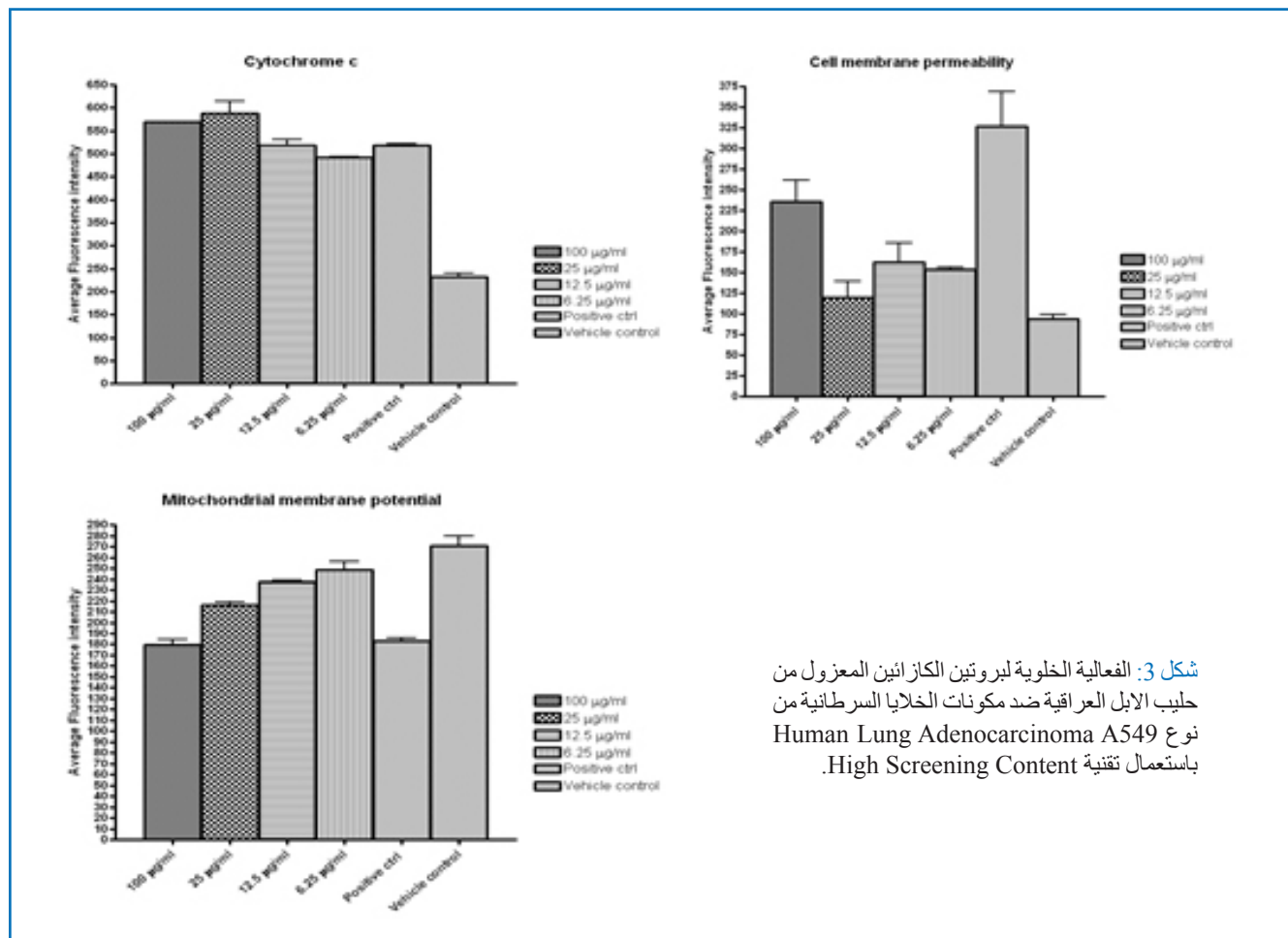
ان بروتين الكازاين في حليب الابل يمتاز بكونه ذو طبيعة كارهة للماء H-drophobic بسبب عدم احتوائه على الاحماض الامينية بوليين ، تايروسين ، سستائين (40) واملاكه لنهاية نتروجينية مغلقة عند طرف الاحماض الامينية (41) (42) (43). كما اوضحت بعض الدراسات على بروتينات حليب الابل



صورة 3: نتائج اختبار High Screening Content لخلايا Human Lung Adenocarcinoma A549 المعاملة ببروتين الكازاين المعزول من حليب الابل العراقية.

tensity في حين ان تركيز 100 مايكروغرام /مل كازائين اعطى اعلى فعالية تجاه نفاذية الغشاء الخلوي cell membrane permeability وتركيز 25 مايكروغرام/مل كازائين اعطى اعلى فعالية تجاه cytochrome C والتركيز 6.2 مايكروغرام/مل كازائين اعطى اعلى فعالية ضد غشاء المايٲوكونديريا -mi-tochondrial membrane potential (شكل 3).

ويوضح الشكل 3 الفعالية الخلوية لبروتين الكازائين المعزول من حليب الابل العراقية ضد الخلايا السرطانية من نوع Human Lung Adenocarcinoma A549 باستعمال تقنية High Screening Content HSC ويظهر من الشكل ان الفعالية التي اظهرها بروتين الكازائين تباينت تبعا للتركيز المستخدم وكذلك تبعا للجزء الذي تأثر بهذه الفعالية فنجد ان تركيز 6.2 مايكروغرام /مل من بروتين الكازائين اعطى اعلى تأثير تجاه المادة النووية i -Total nuclear



شكل 3: الفعالية الخلوية لبروتين الكازائين المعزول من حليب الابل العراقية ضد مكونات الخلايا السرطانية من نوع Human Lung Adenocarcinoma A549 باستعمال تقنية High Screening Content.

بروتين كازائين الحليب المعزول من الابل العراقية ويتضح من الجدول 1 وجود تأثير قاتل للخلايا بفعل المعاملة ببروتين كازائين حليب الابل العراقية بتركيزات مختلفة وكان التأثير متباينا تبعا لنوع الخلايا السرطانية المستخدمة وكذلك اعتمادا على التركيزات المستخدمة ونجد ان نسبة بقاء الخلايا السرطانية قيد الدراسة انخفضت مع زيادة تركيز بروتين الكازائين اي وجود علاقة تناسب عكسية بين التركيز ونسبة بقاء الخلايا السرطانية.

ومن اجل تعميق الدراسة في التأثير السمي للخلايا الذي يمتلكه بروتين الكازائين المعزول من حليب الابل العراقية ، تم اجراء اختبار MTT الذي يعد طريقة طيفية لقياس فعالية الانزيمات الخلوية القادرة على اختزال صبغة Tetr-zolium وتكوين صبغة Formazan التي تتناسب شدتها مع الفعالية الانزيمية التي تمتلكها الخلايا وبالتالي تحديد عدد الخلايا الحية (نسبة البقاء Viability) بعد المعاملة فقد تم استخدام اربعة انواع من الخلايا السرطانية هي , HepG2 , MCF , A549 , PC3 لاطهار التأثير السام للخلايا السرطانية الذي يمتلكه

جدول 1: نسبة بقاء الخلايا السرطانية (خارج الجسم الحي) المعاملة بتركيز مختلفة من بروتين الكازائين المنقى من حليب الابل العراقية باستخدام طريقة MTT.

نسبة بقاء الخلايا %								تركيز بروتين الكازئين (µg/L)
HepG2		PC3		MCF7		A549		
Sd	Mean	Sd	Mean	Sd	Mean	Sd	Mean	
3.24	66.30	2.35	91.97	2.98	64.83	3.25	56.82	100
4.42	83.74	3.08	95.83	3.78	78.80	4.01	82.55	50
3.57	92.71	1.61	97.46	2.58	83.08	3.99	84.48	25
2.51	99.85	2.57	98.06	1.68	83.18	2.65	87.82	12.5
3.05	99.16	1.94	99.08	0.20	85.78	4.06	93.27	6.25
1.54	99.96	3.54	99.48	0.99	94.50	3.58	96.55	3.12

في الخلايا الجذعية السرطانية (53). نستنتج من دراستنا الحالية ان بروتين الكازئين في حليب الابل العراقية يمكن ان يكون مثبطا للخلايا السرطانية ومحددا لنموها وتم التأكد من ذلك بتعزيز النتائج الحالية باجراء اختبار MTT الذي يعد مقياسا لفعالية انزيمات المايوتوكونديريا الاختزالية التي تستند اصلا على شدة لون ال-Formazan الذي يتناسب مع عدد المايوتوكونديريا التي يتناسب عددها طرديا مع عدد الخلايا الحية واتضح من الدراسة الحالية امتلاك الكازئين فعالية مثبطة لاربعة انواع من الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي مما يؤكد امتلاك الكازئين لفعالية مضادة للسرطان وهذا يتفق مع ما وجدته 54 الذي فسر الية تثبيط الخلايا السرطانية عند استعمال الكازئين بسبب امتلاكه لسلاسل ببتيدية ذات فعالية حيوية Bioactive peptides تؤدي وظائف حيوية مهمة للجسم فضلا عن امتلاك الحليب لعناصر كيميائية تزيد من الفعالية السمية الخلوية لبروتينات الحليب بشكل عام (55).

يعتبر الكازئين احد البروتينات الرئيسة للحليب وله دور فسلجي اساسي باعتباره مصدرا للاحماض الامينية اللازمة للنمو وله اهمية كبيرة في الكثير من المهام الوظيفية لاعضاء جسم الانسان (48) ويعد حليب الابل من المواد الطبيعية التي تمتلك العديد من العناصر ذات الفعالية المضادة للخلايا الحية (49) ويمتاز حليب الابل بعدم تأثيره في الخلايا الطبيعية للجسم (50) بينما يمتلك فعالية عالية ضد الخلايا السرطانية بسبب احتوائه على المواد المضادة للاكسدة Antiox-dants التي تعمل على ازالة التأثير الضار للجذور الحرة Free Radicals وبالتالي منع حدوث الورم السرطاني او ازدياد اعداد الخلايا السرطانية (51) كما يمتلك بروتين فعمل مثبط لانواع مختلفة من الخلايا السرطانية كما انه يعمل على تثبيط نمو العديد من انواع الخلايا السرطانية وتنظيم الموت الخلوي المبرمج Apoptosis للخلايا المختلفة (52) يعمل الكازئين على تقليل نمو الخلايا السرطانية بمقدار خمسة مرات وتثبيط حدوث ظاهرة الانبثاث Meta-tasis في سرطان الثدي بمقدار عشر مرات من خلال تثبيط عامل CD44+

المصادر:

- Radwan , R.M. Tabll , A. (2007) Camel lactoferrin markedly inhibits Hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. J.Immunoassay.Immunochem. 28 (3):267-277.
- Dayhoff , M.O. (1976) Atlas of proteins sequence and structure . National Biochemical Research Foundation (USA) 5 : 9-19.
- Magdi , A.O. Ibrahim , E.A. and Hamid , A.D. (2010) Biochemical Changes occurring during fermentation of camel milk by selected bacterial starter cultures. African. J. Biotech.9 (43) : 7331-7336.
- Farah , Z. Rettenmaier , R. and Atkins , D. (1992) Vitamin content of camel milk . Internat. J. Vit. Nutr. Res. 62 :30-33.
- Farah , Z. and Farah-Riesen , B. (1985) Separation and Characterization of major components of camel milk casein. Milchwissenschaft. 40 (11): 669-671.
- Alim , N. Fondrini , F. Bonizzi , I. Feligini , M. and Enne , G. (2005) Characterization of Casein fractions from Algerian dromedary (Camelus dromedarius) milk. Pakistan . J. Nutrition . 4 (2) : 112-116.
- Donato , L. and Guyomarch , F. (2009) Formation and properties of the whey protein /κ-casein complexes in heated skim milk- A Review . Dairy Science Technology. 89 : 3- 29.
- Quita , S.M. and Kurdi , L.A.F. (2010) Antigenotoxic and anticytotoxic effect of camel milk in mice treated with cisplatin . Saudi j. biological Science . 17 : 159-166.
- Hamad , E.M. Abdel-Rahim , E.A. and Romeih , E.A. (2011) Beneficial effect of milk on liver and Kidneys function in diabetic Sprague Dawley rats . Inter. J. Dairy. Sci. 6 (3):190-197.
- Al-Mahdy , O. El-Fakharany , E. El-Dabba , E. and Redwan , E. (2011) Examination of the activity of camel milk casein against Hepatitis C virus (Genotype-4 a) and its apoptotic potential in Hepatoma and Hela cell line . Hepat. Mon. 11 (9):724-730.
- Hassan , A.I. and Bayoumi , M.M. (2010) Efficiency of camel milk and Honey Bee in alleviation of Diabetes in rats. Nature and Science. 8 (10):333-341.
- Al-Humaid , A.I. Mousa , H.M. El-Mergawi , R.A. and Abdel-Salam , A.M. (2010) Chemical composition and antioxidant activity of dates and dates-camel mixtures as a protective meal against lipid peroxidation in rats. Am. J. Food. Technolo. 5 (1): 22-30.**
- Larsson , R.M. and Mohamed , M.A. (1986) Analysis of the casein in camel (Camelus dromedarius) milk . J. Agr. Res. 16:13-18.
- Hiller , R.M. (1976) The Quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. J. Dairy. Res. 43:259-265.
- Salmen , S.H. Abu-Tarboush , H.M. Al-Sahel , A.A. and Metwalli , A.A. (2012) Amino acids content and electrophoretic profile of camel milk casein from different camel breeds in Saudi Arabia . Saudi. J. Biological Science . 19: 177-183.
- Hussien , H.J. (2011) Study to evaluation the camel milk effect to inhibition Streptococcus spp. , Staphylococcus spp. In patients with gingivitis . Al-Kufa J. Veter. Science.1(2):20-27.
- Al-Moussawi , N.H. (2012) Effect of Camels milk on Hematological and Biochemical parameters of male rats treated with zinc chloride. J. Thi-Qar Sci. 3(3): 13-20.
- Affi , M.E. (2010) Effect of camel milk on Cisplatin – Induced Nephrotoxicity in Swiss albino mice . Am. J. Biochem and Biotech. 6: 141-147.
- Chen , Z. Shamsl , F. Kaijun , L. Huang , Q. Al-Rajhi , A. Chaundhry , A. and Wu , K. (2011) Comparison of camel tear proteins between summer and Winter . Molecular Vision 17:323-331.
- Kim , S. Jun , D. Kim , H. Jeony , K. and Lee , Ch. (2011) Development of High content screening method for chemicals modulating DNA damage response. J. Biomol. Screen. www.slas.org.
- Yagil , R. and Etzion , Z. (1980) The effect of drought condition on the quality of camels milk . J. Dairy . Res. 47: 159-166.
- Shalash , M.R. (1979) Utilization of camel meat and

- milk in human nourishment. In: IFS symposium . Camel Sudan.285-306.
23. Khaskheli , M.A. Arian , S. Chaudhry , A.H. Soomro , A. and Qureshi , T.A. (2005) Physico-Chemical quality of camel milk . J. Agri. Soc. Sci. 1(2): 164-166.
 24. Khalifa , M.Y. Niki , R. and Arima , Sh. (1985) Studies on κ -Casein : 1. Fractionation and some properties of κ -Casein fraction . J. Fac. Agr. Hokkaido. Univ. 62(3): 236-255.
 25. Yousif , A. (2012) Separation , Purification , Identification of Immunoproteins in camel milk and study its action against pathogenic bacteria. M. Sc. Thesis . college of Agriculture . University of Basrah.
 26. Urbisinov , Z. Servetnik , G. and Izatullaev , E. (1981) Protein composition of camel milk . VOPR. Pitan. 6 :41-42.
 27. Liang , M. Vivin , Y. Chen , H. Chen , W. (2006) A simple and direct isolation of whey components from raw milk by gel filtration chromatography and structural characterization by Fourier transform Raman Spectroscopy. Talanta , 69: 1269-1277.
 28. Al-Awadi , F.M. and Srikumar , T.S. (2001) Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks . J. Dairy Res. 68 (3): 463-469.
 29. Bradford , M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding . Anal Biochem. 72 :248-254.
 30. El-Fakharany , E. Tabll , A. El-Wahab , A. Haroun , B. and El-Rashdy , M.R. (2008) Potential activity of camel milk amylase and lactoferrin against Hepatitis C virus infectivity in HepG2 and lymphocytes. Hep. Month. 8 (2):101-109.
 31. Hinz , K. Connor , P. and Kelly , A. (2012) Comparison of the principal proteins in Bovine , Caprine , Buffalo , Equine and camel milk. J. Dairy Res. 79:185-191.**
 32. El-Hatmi , H. Girardet , J. Gaillard , J. Yahyaoui , M. and Attai , H. (2007) Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum . Small Ruminants Resaerches. 70 : 267-271.
 33. Kherouatou , N. and Attia , H. (2008) Study for comparative of caseins in camel and Bovines. Science and Technologie. 28:73-79.(Abs)
 34. Shamsia , S.M. (2009) Nutritional and Therapeutic properties of camel and human milks . Int. J. Gene. Molec. Biol. 1 (2) : 52-58.
 35. Al-Agamy , E.I. Nawar , M. A. Shamsia , S. M. and Awad , S. (2008) The convenience of camel milk proteins for the nutrition of cow milk allergic children . J. Saudi Soc. Food and Nutr. 3 (1) : 42-55.
 36. Konuspayeva , G. Faye , B. and Loiseau , G. (2009) The composition of camel milk : A meta- analysis of the literature data – Study review . J. Food .Comp. Anal. 22 : 95-101.
 37. Al-Agamy , E. I. (2007) The Challenge of Cow milk protein allergy. Small Ruminant. Research. 68: 64-72.
 38. Salem , S. A. Al-Agamy , E.I. Salama , F.A. and Abosoliman , N.H. (2009) Isolation , Molecular and Biochemical characterization of goat milk casein and its fraction. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 11 :20-35.
 39. Saliha , S. Z. Dalila , A. Chara , S. Saliha , B. and Mati , A. (2013) Separation and Characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*) . Emir. J. Food. Agricul. 25 (4): 283-290.
 40. Mohammed , A.(1993) Characterization of Camel milk β -Casein . Thesis For Ph.D. Research institute of Chemistry of Karachi.
 41. Kappeler , S. Farah , Z. and Puhan , Z. (1998) Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk casein. J. Diary Research. 65:209-222.
 42. Wangoh , J. Farah , Z. and Puhan , Z. (1998) Iso-electric Focusing of camel milk proteins. Int. Diary j. 8 : 617-621.
 43. Goldfarb , M. (2001) Analysis of Casein using two Dimensional Electrophoresis , Western Blot , and Computer Imaging . Bioactive components of human Milk Advances in Experimental Medicine and Biology. 501:535-539.
 44. Khan , B.B. and Iqbal , A. (2001) Production and composition of camel milk . Review. Pak. Agri. Sci. 38 (3-4) : 64-68.
 45. Haney , S.A. (2008) High Content Screening . Science Techniques and Applications. New York. Wiley-Interscience.
 46. Gasparri , F. (2009) An Overview of Cell Phenotypes in HCS : Limitations and advantages . Expert Opinion on Drug Discovery. 4 (6): 643-657.
 47. Holt , C. (1997) The Milk salts and their interaction with casein . In Fox P.F. advanced Dairy chemistry . London. Chapman and Hall.
 48. Ewina , M.A. (2006) Comparative Biochemical and Microbiological studies of Camels , Cow and Mature mothers milk . Kafr-El-Sheik . Vet. Med. J. 4 (1) : 225-230.
 49. El-Elyni , R.A. and Khalifa , S.A. (2006) Histological studies on the effect of Camels urine and milk on stomach of Albino mice. Saudi J. Biol. Scien. 13 (2):63-69.
 50. Abdel-Majeed , N.A. (2005) Comparative effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1. J. Saudi Chem. Soc. 9 (2) : 253-264.
 51. Martinez , E. Cordero , C. and Osorio , E. (2012) Casein induces the proliferation of bone marrow mononuclear cells , Apoptosis , of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in leukemia mouse model. Oncology letters. 4 :461-466.
 52. Bonuccelli , G. Cros , R. and Sotgia , F. (2012) The milk protein α -Casein functions as a tumor suppresser via activation of STAT1 Signaling , effectively preventing breast cancer tumor growth amd metastasis . Landes Biosciences Journals. 11 (21): 3972-3982.
 53. Phelan , M. Aherne , S. and Nora , M. (2010) Growth inhibitory effect of Casein hydrolysates on human cancer cell lines. J. Dairy . Res. 77 : 176-182.
 54. Ahmadi , M. and Najafi , M. (2010) Effect of camel milk on different cell lines and normal cells. Camel and Biomolecular Science conference. University of Tahrn . Iran.

Isolation and Purification of Casein from Iraqi Camels' Milk (*Camelus dromedaries*) and Evaluation of Its Activity Against Some Types of Cancer Cells in vitro

Mohammed Qais Al-Ani

University Of Anbar-College of Science

.....

Abstract:

This study aimed to isolate and purify the casein from Iraqi camels' milk and evaluating its activity against some types of cancer cells in vitro . The study included the isolation of casein in acidic medium (pH=4.6) and its purification in DEAE-Cellulose ion exchanger and Sephadex G-200 Gel filtration .To verify the purity of isolated casein, electrophoresis has been achieved on PAGE. To specify the immunological behavior for the partially purified casein , immunoblotting has been achieved by Western Blot . To recognize the cytotoxicity of casein , High Screening Content (HSC) against Human Lung Adenocarcinoma A549 has been achieved . To evaluate the inhibiting ability against four types of cancer cells (A549 , MCF7 , PC3 , HePG2) . The availability of cell has been determined by MTT test. The results showed that casein had three peaks on DEAE-Cellulose and Sephadex G-200 for each column . By the use of electrophoresis on PAGE , a band similar to standard casein appeared . Also , casein showed immunological behavior depending upon the concentration in western blot test. The results showed that casein had inhibiting ability against cancer cells the proportion was reversal between casein and cancer cells availability . Casein had different inhibition activity against cancer cells content. We conclude , partially purified casein from Iraqi camels' milk had inhibiting activity against certain types of cancer cell in vitro