



IQ (19)

جمهورية العراق
وزارة التخطيط

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
قسم الملكية الصناعية

براءة اختراع

(12)

(51) التصنيف الدولي

(11) رقم البراءة : 3700

C12N7/00
A61K35/00

(21) رقم الطلب : 2012/19

(22) تاريخ تقديم الطلب : 2012/1/18

(52) التصنيف العراقي 6

(30) تاريخ طلب الاسبقية - بلد الاسبقية - رقم طلب الاسبقية :

(45) تاريخ منح البراءة : 2013/11/27

(72) اسم المخترع وعنوانه : 1- د. احمد مجيد حمزة / الجامعة المستنصرية/المركز العراقي لبحوث السرطان
2- د.ناهي يوسف ياسين / والوراثة الطبية
3- د. محمد جويد علوان /جامعة بغداد /كلية الطب البيطري

(73) اسم صاحب البراءة : الذوات اعلاه

(74) اسم الوكيل :

(54) تسمية الاختراع :

فايروس مرض النيوكاسل العترة العراقية كعلاج للأورام .

د.د. علي يوسف الشكري
مدير
توثيق
رئيس جهاز

منحت هذه البراءة استناداً لأحكام المادة 21 من قانون
براءات الاختراع والنماذج الصناعية رقم 65 لسنة
1970 المعدل وعلى مسؤولية المخترع .

فايروس مرض النيوكاسل العترة العراقية كعلاج للأورام

Newcastle disease virus Iraqi strain as cancer therapy

Abstract

The avian paramyxovirus, Newcastle disease virus (NDV), is considered to be very promising. Since cytolytic strains of NDV possess a number of desirable properties in this regard. To evaluate the effectiveness of NDV Iraqi isolate (NDV-Iraqi Ahmed Nahi – IAN) as a tumor cytolytic agent, we have performed in vitro and in vivo experiments. In vitro tests studied oncolytic activity on different tumor cell lines by light and electron microscope. In vivo experiment using murine mammary adenocarcinoma allograft grown in mice. We compared antitumor activity of intratumoral injection of NDV-IAN to systemic intraperitoneal treatment. In vitro results revealed necrosis and apoptosis induction. While in vivo results showed intratumoral treatment caused average of 92% growth inhibition ($p < 0.0001$), while intraperitoneal treatment show 79% growth inhibition at the end of the experiment ($p < 0.0001$) compared to control group. Furthermore treatment groups showed prolong surviving. Histopathological pictures showed massive area of necrosis with infiltration of inflammatory cells mainly lymphocyte. Ultrastructural study showed budding of the virus from the treated tumor cells. Our results suggest that NDV Iraqi isolate (NDV-IAN) as a promising antitumor agent.

الموجز:

أستعمال فايروس النيوكاسل العزلة العراقية كعلاج للسرطان يعد الأول من نوعه في القطر العراقي وفي العالم ,والبحت المستمر عن علاج فاعل وامين وذلك لأهمية وخطورة الإصابة بالسرطان الذي يعد من الأمراض المهلكة للإنسان ، ويعد ثاني مرض مسبب للموت في العالم بعد الإصابة بأمراض القلب والشرابين (Stevens and Lowe,2000).

ولأن العلاجات التقليدية كالعلاج الجراحي والعلاج الكيميائي والإشعاعي لم يثبت كونها علاجات شافية (Kirm, 2000) ، لذا فقد تم اختيار واحد من العلاجات الإحيائية الواعدة والذي يجمع بين خصائص العلاج الجيني والعلاج المناعي وهو العلاج الفايروسي باستعمال فايروس النيوكاسل حيث اظهرت العترة العالمية المختلفه نتائج واعده (Nelson , 2000 , Nelson,1999) ونحن قمنا باستعمال ودراسة فايروس النيوكاسل العترة العراقية الضارية حيث تم إجراء دراسة شاملة عن الجوانب العلاجية كافة للفايروس على الخلايا السرطانية سواء في خارج الجسم *invitro* أو في داخل جسم الكائن الحي *invivo* .

تعتمد فكرة الاختراع على وجود قابلية لفايروس النيوكاسل العترة العراقية على النمو والتكاثر في الخلايا السرطانية وقتلها من دون اصابة الخلايا الطبيعية وعدم القدرة على التكاثر فيها مما يوفر واحدة من اهم الخصائص المطلوبة في علاجات الاورام وهي الامان والفعالية المضادة للورم, ونحن قمنا بتطوير هذه العترة وتنقيتها وتطويعها للنمو على الخلايا السرطانية من خلال تمريرات متتالية على الخلايا السرطانية.

وتعد دراستنا هي الاولى من نوعها في العالم باستخدام العترة المحلية العراقية والتي لم يسبقنا اليها احد والتي تتميز بخصائص تميزها عن العترة الاخرى حيث اظهرت نتائج مثبته للنمو لانواع مختلفه من الاورام المزروعه في المختبر والمزروعه في الحيوانات المختبرية واطهرت دراساتنا التي امتدت على مدى سنوات عشر ان الفايروس الان جاهز الى الانتقال الى المرحلة السريرية, وبما اننا اول من اكتشف واستعمل الفايروس العراقي كعلاج ومازلنا نعمل عليه لتحويله الى علاج فنحن نحتاج الى حماية حقوقنا الفكرية للاستمرار في المرحلة السريرية التي تتطلب تمويل وعمل كثير.

مقدمة:

يعد السرطان من الأمراض الخطيرة والمهلكة للإنسان ، وثاني مسبب للموت في العالم بعد الإصابة بأمراض القلب والشرابيين (Stevens and Lowe,2000)، وأن أغلب العلاجات الحالية لمرض السرطان كالعلاج الجراحي والعلاج الإشعاعي والعلاج الكيميائي ذات فوائد محدودة فضلا عن تأثيراتها الجانبية ، لذا ظهرت الحاجة إلى علاجات جديدة فعالة ضد السرطان (Kirn,2000)، وهكذا ظهر مجال العلاج الأحيائي biotherapy الذي يشمل العلاج المناعي والجيني والفايروسى إلى جانب العلاجات التقليدية (Abernathy,2000) ، والتي تستهدف التغيرات الوراثية الموجودة في الخلايا السرطانية واستغلال بعض العوامل الجديدة التي لها انتقائية باتجاه الخلايا السرطانية (Kirn and McCormick,1996)، ومن بين تلك العوامل التي تمتلك الخواص المرغوبة هي الفايروسات الحالة للسرطان Oncolytic viruses التي تمتلك انتقائية باتجاه الأورام (Smith and Chiocca, 2000)، ومن بين تلك الفايروسات الحالة للسرطان وذات القدرة على التكاثف في مختلف أنواع الخلايا السرطانية التي تمتلك خواص تحفيز مناعية عالية هو فايروس النيوكاسل الذي ينتمي لعائلة Paramyxoviridae (Schirmacher *et al* , 1999) .

ويتميز فايروس النيوكاسل بوجود عتر مختلفة: الضارية Velogenic ، متوسطة الضراوة mesogenic وغير الضارية Lentogenic (Alexander, 2000) والتي صنفت أيضاً على أساس أنها حالة أو غير حالة للسرطان تبعاً لكفاءتها في التكاثف داخل الخلايا السرطانية وكلما كانت أسرع في قتل تلك الخلايا (Schirmacher *et al* , 1999) كما أشار (Eli *et al*, 1996) إلى أن العتر الضارية هي عتر حالة للسرطان وهي تتباين في قوتها. وقد استعملت العتر العالمية المختلفه لفايروس النيوكاسل واغلب العتر العالمية في مراحل الاختبار كعلاج للسرطان ونحن درسنا العترة العراقية المعزولة محليا والتي اثبتت كفاءة عالية على الخلايا السرطانية المزروعة في المختبر والاورام المغروسة في الفئران كما سنبين لاحقا ونظراً لانتشار مرض السرطان في القطر العراقي أولاً وعدم وجود علاجات كفوءة ثانياً ، ولكون العلاج الفايروسي باستعمال فايروس النيوكاسل (الذي يجمع بين خصائص العلاج الجيني والمناعي) أظهر كفاءة واعدة متباينة في علاج السرطان بالعتر الضارية المختلفة عالمياً ، لذلك هدف عملنا الى تطوير عترة جديدة وتميزة بفعاليتها وامن استعمالها.

يحتوي الفايروس على غلاف ثنائي الطبقة الدهنية Lipid bilayer مشتق من الغشاء البلازمي للخلية المضيف ، شكل الفايروس كروي عموماً spherical ذو قطر يتراوح من 150-350nm وقد تكون ذات أشكال متعددة Pleomorphic أو ذات شكل خيطي Filamentous

(Lamb and Kolakofsky,1996)، وتحوي الطبقة الثنائية الدهنية لغلاف الفايروس أشواك spike كلايكوبروتينية Glycoproteins تمتد تقريباً 8-12 nm من السطح ، وتكون على نوعين: الأول جزئية الالتصاق (HN) Hemagglutinin-neuraminidase وبروتين الاندماج (F) Fusion proteins (Takimoto *et al*, 2000)، ويوجد داخل غلاف الفايروس النيوكليوكابسد الحلزونية (nucleocapsid core) المحتوية على الحامض النووي الرايبى

RNA ذو السلسلة المنفردة غير المقسم ذو القطبية السالبة ، المحتوي على ستة مورثات تشفر إلى ست بروتينات وهي:

(F) Fusion (M) matrix protein ; (P) phosphoprotein; (NP) nucleocapsid
Large polymerase protein (L) ; protien;

(Aldous and Alexander, 2001, DeLeeuw and Peeters, 1999)

طرق العمل:

الفئران: تم استعمال فئران نوع Swiss Albino بعمر 6-10 أسابيع وتم تربيتها في البيت الحيواني وبظروف مثالية من فرشاة معقمة وماء معقم وغذاء متوازن.

التخفيض المناعي للفئران لغرض غرس الاورام البشرية: تم القيام بعملية التثبيط المناعي وذلك عن طريق استعمال الادوية المثبطة للمناعة مثل مادة Cyclosporine A وعملية إزالة الغدة الزعترية من الفئران حديثة الولادة وبعمر ساعة واحدة عن طريق عمل فتحة جراحية في منطقة الصدر وإزالة الغدة الزعترية بعملية الشفط ومن ثم القيام بخياطة الحيوان. وبعد بلوغ الحيوانات عمر شهرين والتي كان خلالها تقديم طعام وماء معقم للحيوانات تم تشيعها (Shimadza-Japan) (cobalt-60 source (38 rad/ min) وبعد ذلك بأسبوع تم غرس الخلايا السرطانية المأخوذة جراحيا من مريضة بسرطان المعدة والمشخص بكونه spindle cell sarcoma.

خط خلايا AN3 القابل للغرس في الفئران:

تم استعمال هذا الخط لسرطان الغدة اللبنية الفاري والحائز على براءة اختراع كنموذج ورمي لاجراء التجارب العلاجية حيث يتم غرس الاورام تحت الجلد بادخال الابرة من المنطقه الفخذية وصولا الى المنطقه العنقية حيث تدفع الخلايا هناك لتكون وربما بعد مرور اسبوعين, ويتم استعمال الفئران الحاملة للاورام في التجارب العلاجية عند وصول حجم الورم الى 0.5 سم في احد اقطاره وتوزع الحيوانات عشوائيا على التجارب العلاجية

خطوط الخلايا السرطانية Tumor cell lines

تم استعمال الخطوط السرطانية التالية في دراسة الفعل المضاد لنمو الاورام Hep-2 وهو سرطان حنجرة بشري, RD وهو سرطان الخلية العضلية البشري و AMN3 وهو سرطان الغدة اللبنية الفاري و Glioblastoma وهو سرطان الدماغ البشري وتم استعمال الخطوط الطبيعية التالية , خلايا الارومة الليفية الفاري وخلايا الارومه الليفة للجرذان ، وهذا الخطوط منمات على وسط RPMI-1640 مجهز ب 10% مصل عجل البقر وحين تكون الطبقة الأحادية الكاملة Confluent يتم معاملة الخلايا بمحلول التريسين/ فرسين لعمل المزرعة الثانوية لها . subculture

عزل وتنمية فايروس النيوكاسل:

تمت مراحل العزل بالخطوات ادناه:

1. عينة الفايروس

تم الحصول على عالق أعضاء لحيوانات مصابة من كلية الطب البيطري/جامعة بغداد ، محضر بسحن أعضاء دجاج مصاب بمرض النيوكاسل عام 2001 ، وأضيف للعالق 200 IU/مل بنسلين و 200 µg/مل ستربتومايسين (الساعدي ، 2003) ، وأخذ الطافي بعد ترسيب العالق في جهاز النبذ المركزي (30 دقيقة ، 3000 rpm ، 4°C) .

2. الحقن في أجنة البيض النامي

تم الحقن حسب طريقة Allan *et al* , 1978 حيث حقن عالق الأعضاء في كيس الألتنوي لغرض عزل وتنمية الفايروس في أجنة البيض النامي بعمر 10 أيام وذلك بعد فحص جنين البيضة بالمصباح الكهربائي للتأكد من حيويته وموقعه وتحديد منطقة خالية من الأوعية الدموية ، ثم عقت قشرة البيضة في منطقة الفسحة الهوائية بواسطة محلول الأيودين Iodine وفي موقع بعيد عن الجنين وخالٍ من الأوعية الدموية ، حيث تنقب قشرة البيضة بمسافة 0.4 سم فوق حدود الفسحة الهوائية ، ويحقن 0.1 مل من العالق باستعمال أبرة أنسولين بإدخال الإبرة بعمق 0.5 سم في تجويف الألتنوي ، وبعد الحقن يغلق الثقب بشمع البرافين ويوضع البيض المحقون في الحاضنة عند 37°C ، أما بيض مجموعة السيطرة فيحقن بمحلول دارى الفوسفات فقط ويتم فحص البيض يومياً.

قبل حصد السائل الألتنوي من البيض المحقون ، يتم وضع البيض في الثلجة (4°C) لمدة 24 ساعة ، بعدها يتم فحص البيض داخل الكابينة المعقمة عن طريق تعقيم قشرة البيضة وكسرها من منطقة الفسحة الهوائية بواسطة مقص معقم ثم يمزق الغشاء اللقائقي المشيمي وحصد السائل الألتنوي ، ودور السائل المحصود في جهاز النبذ المركزي المبرد (2000 rpm / 30 دقيقة / 4°C) . ثم ترشح السائل عبر (0.45) فلتر ووزع في عبوات صغيرة 2 مل وخرن السائل عند - 20°C أو -196 في النايتروجين السائل لحين استعماله في التمريرات التالية وإجراء فحص التلازن.

3. اختبار التلازن الدموي Hemagglutination test

i. تحضير كريات الدم الحمر للدجاج

تم سحب الدم من الوريد الجناحي للدجاج بمحقنة طبية معقمة حاوية على محلول مانع التخثر الهيبارين Heparin بمقدار 1 : 10 دم ثم يوضع الدم في أنبوبة اختبار معقمة حاوية على 5 مل من محلول دارى الفوسفات المعقم ذي الأس الهيدروجيني (pH: 7.2) ثم يحرك المزيج ويدور في جهاز النبذ المركزي المبرد (1000 rpm/دقيقة - 10 دقائق 4°C) ثم يفصل السائل الطافي عن كريات الدم الحمراء المترسبة ، ثم تغسل خلايا الدم ثلاث مرات بمحلول دارى الفوسفات بنفس الطريقة أعلاه ، وأخيراً يتم عمل عالق لكريات الدم الحمر للدجاج بتركيز 1% بمحلول دارى الفوسفات (PBS).

ii. اختبار التلازن الدموي

استعمل هذا الاختبار لتعيين وجود الفايروس الملزّن لكريات الدم الحمر المعزول في سائل الألتنوي ، ولتحديد معيار الفايروس الملزّن لكريات الدم الحمر استعملت طريقة المعايرة الدقيقة ، وذلك باستعمال أطباق المعايرة الدقيقة التي تحتوي على 96 حفرة ذات السطوح المقعرة (V-shap) ، حيث خفف 0.025 مل من السائل المحصود من البيض المحقون بفايروس النيوكاسل تخفيفاً ثنائياً بمحلول دارى الفوسفات (PBS) في طبق المعايرة الدقيقة ، ثم أضيف 0.025 مل من عالق كريات الدم الحمر للدجاج المحضرة وبتركيز 1% إلى الطبق ، ثم تترك مدة 20-30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ، وراقب الاختبار مجموعة سيطرة متمثلة بسائل الألتنوي المحصود من بيض السيطرة السالب .

- تصوير الفايروس بالمجهر الإلكتروني

تم تصوير الفايروس بالمجهر الإلكتروني النافذ بطريقة الصبغة السالبة negative stain ، حيث تم أخذ قطرات من السائل الألتنوي للبيض المصاب والمستعمل في العلاج وتم تقطيره على المشبك النحاسي الخاص الحاوي على مادة Formvar وصبغت باستعمال مادة phosphotengstic acid لمدة دقيقتين وفحصت بالمجهر الإلكتروني النافذ في وحدة المجهر الإلكتروني في كلية الطب جامعة النهرين قسم علم الأحياء لتشخيص وتصوير الفايروس (Hayat, 1989)

- اختبار السمية الخلوية للفايروس على الخلايا السرطانية

Virus cytotoxicity assay on tumor cells

تم ذلك باستعمال أطباق المعايرة للزرع النسيجي متعددة الحفر (96 حفرة) مسطحة القعر ، حيث زرعت الخلايا فيها بمختلف أنواع خطوط الخلايا المتوفرة من أوعية الزرع النسيجي 25 سم² ، وذلك بعد معاملة محلول التريسين/ فرسين وتفكيكها ثم يضاف 12-13 مل وسط نمو ويمزج جيداً ثم يأخذ 0.2 مل من العالق الخلوي لتوضع في كل حفرة باستعمال الماصة الدقيقة (10⁵ × 1 خلية/حفرة) وبمعدل 5 أعمدة للاختبار الواحد (4 لتصاب بالفايروس ، 1 كسيطرة) .

يترك الطبق في الحاضنة 37°C لمدة 12-18 ساعة الى حين تكون الطبقة الأحادية الكاملة ، ثم يحقن
 الفايروس بسلسلة من التخافيف العشرية في الوسط الحافظ ويترك في درجة حرارة 37°C لمدة ساعة
 للادمصاص (Virus adsorption) ، بعدها تسكب التخافيف ، وتغسل الخلايا مرة واحدة باستعمال وسط حافظ
 بعدها تحضن لمدة 3 أيام في الحاضنة 37°C مع وسط نمو كامل ويقاس تأثير الفايروس بالقراءة العيانية عن
 طريق التصبغ بصبغة البنفسج البلوري Crystal violet 1% ، وذلك بعد تثبيت الخلايا بمحلول الفورمالدهايد
 المتعادل 10% في الثلجة 4°C لمدة 4 ساعات. كما تؤكد النتائج بطريقة ال MTT ويقاس فعل الفايروس
 بجهاز قارئ الصفائح الدقيقة microplate reader ويتم احتساب نسبة القتل بالمعادلة التاليه:
 نسبة التثبيت = عدد خلايا السيطرة غير المعاملة - عدد الخلايا المعاملة بالفايروس / عدد خلايا السيطرة
 . (Ahlert and Shirrmacher, 1990 ; Lorence et al, 1994) .

- دراسة التأثير المحلل للفايروس على الخلايا السرطانية في خارج الجسم Study of the oncolytic effect of NDV on tumor cells *in vitro*

1. دراسة التأثير المحلل للفايروس على الخلايا السرطانية باستعمال المجهر الضوئي
 يتم ذلك بزرع خطوط الخلايا السرطانية على سلايد الزرع النسيجي ذي الثمان غرف وكما ذكر سابقاً ،
 وبعد تكون الطبقة الكاملة يحقن الفايروس بسلسلة من التخافيف العشرية في الوسط الحافظ بمقدار 0.4 لكل غرفة
 Chamber وتترك لمدة ساعة لغرض إدمصاص الفايروس ، بعدها تغسل الخلايا بوسط حافظ وتحضن الخلايا
 37°C بوسط حافظ لمدة ثلاثة أيام ، بعدها يتم سكب الوسط الحافظ وتغسل الخلايا بدارئ الفوسفات المعقم PBS
 مرتان بعدها يتم تثبيتها باستعمال الفورمالين المتعادل 10% لتصبغ بعدها باستعمال صبغة
 الهيماتوكسلين/أبوسين. كما يتم التأكد من اصابة الفايروس للخلايا بتصيفها بأجسام مضادة احادية النسيلة
 متخصصة للمستضد HN الخاص بفايروس النيوكاسل والعده مجهزة من شركة (TropBio Pty Ltd,
 James Cook University, Townsville Queensland, Australia).

2. دراسة التأثير المحلل للفايروس على الخلايا السرطانية باستعمال المجهر الإلكتروني النافذ
 يتم زرع الخلايا السرطانية في أوعية الزرع النسيجي سعة 75 سم² وبعد تكون الطبقة الكاملة تحقن
 الخلايا بسائل الألتوي المخفف بنسبة 1 : 2 بالوسط الزرع الحافظ وذلك بعد إزالة الوسط الزرع من أوعية
 الزرع النسيجي ، وتحقن الخلايا بكمية 2 مل لمدة ساعة 37°C ، وبعد الحضان يتم إزالة السائل المحقون في
 أوعية الزرع النسيجي ، ثم يتم إضافة 12 مل من الوسط الزرع الحافظ Maintenance media إلى كل
 قنينة ، وتحضن بدرجة 37°C ، وبعد 72 ساعة يتم تثبيت الخلايا بمادة الكلوترالدهايد بعد غسلها بمحلول دارئ
 الفوسفات PBS وتحضر للفحص بالمجهر الإلكتروني.

- اختبار الامتزاز الدموي Hemadsorption test
 اتبعت طريقة (Haas at al, 1998) مع التعديل وذلك بإضافة كريات الدم الحمر للدجاج و الإنسان و
 الفأر بعد مرور 20 ساعة من حقن الطبقة الكاملة النمو للخلايا السرطانية في الشرائح الزجاجية الخاصة بالزرع
 النسيجي lab-tek بفايروس النيوكاسل بكمية (0.1 مل) لكل غرفة ، إذ سكب الوسط الزرع وغسلت الخلايا
 بالمحلول الدارئ الفوسفاتي المعقم ذي الأس الهيدروجيني (7.2 : Ph) ثم أضيف 0.3 مل من كريات الدم
 الحمراء (0.5%) للخلايا السرطانية وتركت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4°C ثم سكب كريات الدم الحمر
 وغسلت مرتين بالمحلول الدارئ الفوسفاتي المعقم البارد 4°C لإزالة بقية كريات الدم الحمر غير الملتصقة ، أما
 كريات الدم الحمر الملتصقة فقد ثبتت بإضافة (0.3 مل) من محلول الفورمالين المتعادل 10% وحضنت مرة
 ثانية بدرجة 4°C مدة 30 دقيقة وقد رافق التجربة مجموعة السيطرة من الخلايا السرطانية غير المحقونة
 بالفايروس ، تم الفحص بالمجهر الضوئي لملاحظة الامتزاز الدموي (Bell et al , 1985) .

- اختبار التصاق اللمفوسايت Lymphocyte adhesion assay
 تم زرع الخلايا السرطانية من الخطوط السرطانية المذكورة سابقاً في الشريحة الزجاجية الخاصة
 بالزرع النسيجي ذات الثمان غرف وبتركيز (1.5×10^5 - 2 خلية/غرفة) في وسط نمو كامل ، وبعد 12-18
 ساعة كونت الخلايا طبقة كاملة عندها تغسل الخلايا لمرة واحدة بالدارئ الفوسفاتي PBS ، وتحقن الخلايا
 بفايروس النيوكاسل لمدة 20 ساعة في وسط حافظ (37°C) ، ويسكب الوسط الحافظ ويتم إضافة الخلايا للمفاوية
 المعزولة كما ذكرنا سابقاً لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة ، ثم غسلت الخلايا ثلاث مرات لإزالة الخلايا غير

الملتصقة بعدها تثبت بالفورمالين المتعادل 10% لمدة 15 دقيقة في 4°C وتصبغ بعدها باستعمال صبغة H & E وتحسب الخلايا حينها (Hass et al, 1998). كما تمت دراسة تلك الخلايا المفاوية الملتصقة لتحديد نوعها باستعمال الاجسام المضادة الاحادية النسيهه لل CD4 و CD8 والمجهزة من شركة USbiological وبطريقة الفلورسين المتألق.

دراسة قابلية فايروس النيوكاسل العترة العراقية على استحداث الموت المبرمج في الاورام السرطانية المزروعة في المختبر:

تم استعمال العدة التشخيصية الخاصة بقياس نفاذية غشاء بيوت الطاقة mitochondria وذلك لكونها اول من يتأثر عند حدوث الموت المبرمج للخلية Apoptosis وقد استعملنا العدة التشخيصية الخاصة بهذا من شركة The BioAssay™ Apoptosis Detection Kit (USbiological, USA) وقد تم دراسة التأثير على الخطوط الخلوية التالية: AMN3, Hep-2, RD, Glioblastoma حيث تم اصابة الخلايا بالفايروس لمدة ساعة ثم تم غسل الخلايا وحضنت لمدة 24 ساعة ثم تم اضافة الصبغة المجهزة مع العدة والتي من المفترض ان تدخل الى داخل الخلية وتشع باللون الاخضر عند بقائها في هيولي الخلية ثم تدل الى داخل بيوت الطاقة للتفاعل مع انزيماتا وتشع باللون الاحمر وهذا دلالة على ان الخلايا سليمة ولا تعاني موت مبرمج والخلايا اللتي تشع لون اخضر تعني ان بيوت الطاقة تعاني موت مبرمج وقد حدث اختلال في نفاذيتها لم يسمح بدخول تلك المادة وبالتالي لا يوجد بالخلية الا اللون الاخضر وهذا يعتبر دلالة على انها تعاني موت مبرمج. تفحص الخلايا تحت المجهر المتألق fluorescent microscope .

- تصميم التجارب العلاجية Therapeutic Experiments Design

1. التجارب العلاجية على النماذج السرطانية البشرية

Therapeutic Experiments on human tumor models

تضم 10 فئران مخفضة مناعياً تزرع بعينات السرطان المعدة البشري في فئران مخفضة مناعياً بالتشجيع باشعة كما وازالة الغدة الزعترية وحين نمو الورم تقسم الحيوانات إلى مجموعتين ، المجموعة الأولى تعالج بالحقن المباشر للفايروس بالورم (I.T) Intratumoral injection باستعمال محقنة انسولين، أما المجموعة الثانية فتقسم إلى قسمين ، القسم الأول تحقن بسائل الألتنوي المحصود من البيض غير المصاب ، أما القسم الثاني فيترك كسيطرة.

2. التجارب العلاجية على النماذج السرطانية الفئرية

Therapeutic Experiments on Mouse tumor models

وتشمل على (4) تجارب كما في المخطط رقم (1)

1. التجربة الأولى

وتضم 50 حيوانا مخفضا مناعياً تغرس فيها الخلايا السرطانية من خط (AN3) مع الاستمرار بالتخفيض المناعي الى نهاية التجربة، وبعد نمو الكتلة السرطانية في الحيوانات يتم تقسيمها إلى ثلاثة أقسام متساوية ، يعالج القسم الأول بالحقن المباشر للفايروس داخل الورم (I.T) التي بدورها تقسم الى مجموعتين مجموعة تعطى حقنيتين فقط ومجموعة كل ثلاثة ايام (حقنات متعددة) ، أما القسم الثاني فيعالج بالحقن داخل الخلب (I.P) intrapretonial injection ، وبمجموعتين كما ذكر اعلاه ، أما القسم الأخير فيقسم الى مجموعتين ايضا ، الاولى (السيطرة الموجبة) فيحقن نصفها بالسائل الألتنوي فقط داخل الخلب والنصف الثاني فتحقن داخل الورم ، أما المجموعة الثانية (السيطرة السالبة) فتبقى من دون حقن.

2. التجربة الثانية

واستخدم فيها 20 حيوانا مغروسا بسرطان الغدة اللبنية لخط AN3 وبدون تخفيض مناعي وحين نمو الورم تقسم إلى أربعة أقسام : القسم الأول يعالج بالحقن المتعدد داخل الورم I.T ، القسم الثاني يعالج بالحقن المتعدد داخل البريتون I.P ، القسم الثالث فيحقن بسائل الألتنوي فقط ، أما القسم الرابع فيعد سيطرة.

- معايير الدراسة

تم تسجيل قياسات النمو السرطاني ولجميع حيوانات التجربة حسب المعادلة التالية:

$$\text{Tumor volume} = - a.b^2/2$$

حيث a = الطول = b العرض (Grote et al, 2001)

كما يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم Growth inhibition حسب (Phuangsab et al, 2001) :

$$G.I \text{ تثبيط النمو } \% = \frac{\text{حجم الورم في المجموعة غير المعالجة} - \text{حجم الورم في المجموعة المعالجة}}{\text{حجم الورم في المجموعة غير المعالجة}} \times 100$$

- اختبار سمية فيروس النيوكاسل على الفئران الطبيعية

وتشمل تجربتين :

i. تجربة اختبار سمية فيروس النيوكاسل على الفئران حديثة الولادة

Neonatal toxicity test

- المجموعة الأولى : وتضم 7 فئران حديثة الولادة تم حقنها بالفايروس في القحف intracranial injection (I.C).

- المجموعة الثانية : وتضم 7 فئران حديثة الولادة تم حقنها بفايروس النيوكاسل في منطقة البريتون (I.P).

ii. تجربة اختبار سمية فيروس النيوكاسل على الفئران البالغة الطبيعية adult toxicity test

وتشمل على مجموعتين:

- المجموعة الأولى : وتضم 5 فئران (8-12 أسبوعاً) يتم حقنها بفايروس النيوكاسل في القحف (I.C).

- المجموعة الثانية : وتضم 5 فئران بالغة (8-12 أسبوعاً) يتم حقنها بفايروس النيوكاسل في منطقة الخلب (I.P) Intrapriton (Phuangsab et al, 2001).

الفحوصات النسيجية:

تم اخذ عينات من الأورام النامية في الفئران المغروسة وحفظها بالفورمالين ومن ثم تم معاملتها وتقطيعها وتصبيغها بالصبغات التقليدية هيماتوكسلين ايبوسين.

فحوصات الكيمياء المناعية النسيجية:

لغرض دراسة استحداث الموت المبرمج في الاورام المغروسة في الفئران من قبل فايروس النيوكاسل العترة العراقية تم استعمال الاجسام المضادة الاحادية النسييلة ل caspases-12 ولدراسة ارتشاح الخلايا المناعية لموقع الورم تم استعمال اجسام مضادة ل CD8 و CD56 وتفحص بنفس الطريقة وجود مستضدات الفايروس باستخدام anti-HN NDV mAb و مجهزة من (TropBio Pty Ltd, James Cook University, Townsville Queensland, Australia).

الفحوصات المناعية للوسائط الخلوية IFN-g في الفئران المعالجه:

تم استعمال تقنية الاليزا ELISA وبعده مجهزة من شركة (Mabtech, Sweden) لدراسة مستوى الوسائط الخلوية في امصال الفئران المعالجه وغير المعالجه حيث تم سحب دم من الفئران وعلى فترات مختلفة طيلة فترة العلاج

دراسة مستوى الاجسام المضادة في دم الفئران المعالجه بفايروس النيوكاسل العترة العراقية:

وتم استعمال طريقة competitive ELISA بعبء تشخيصية مجهزة من شركة SVANOVA السويدية حيث تم جمع الامصال من الفئران المعالجه بعد اسبوع واسبوعان واربعه اسابيع من العلاج

دراسة مستوى فايروس النيوكاسل في دم الفئران المعالجه:

تم استعمال تقنية الاليزا ELISA وبعده مجهزة من شركة

(TropBio Pty Ltd, James Cook University, Townsville Queensland, Australia).

لدراسة مستوى فايروس النيوكاسل في امصال الفئران المعالجه وغير المعالجه حيث تم سحب دم من الفئران وعلى فترات مختلفة طيلة فترة العلاج

-التحليل الأحصائي

خضعت نتائج الدراسة إلى التحليل الأحصائي بهدف معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدونة في المجاميع ، وعدت الفروق عالية المعنوية على مستوى (1%) لأحتمال الخطأ ، ومهمة معنوياً على مستوى (5%) لإحتمال الخطأ ، وأجريت الأختبارات التالية باستعمال برنامج SPSS الأحصائي:

1. اختبار تي Student t-test
2. تحليل التباين الثنائي Two ways analysis of variance
3. الفرق المعنوي الأصغر (LSD) Least Significant Difference
4. اختبار لوك-رانك Log-Rank Test



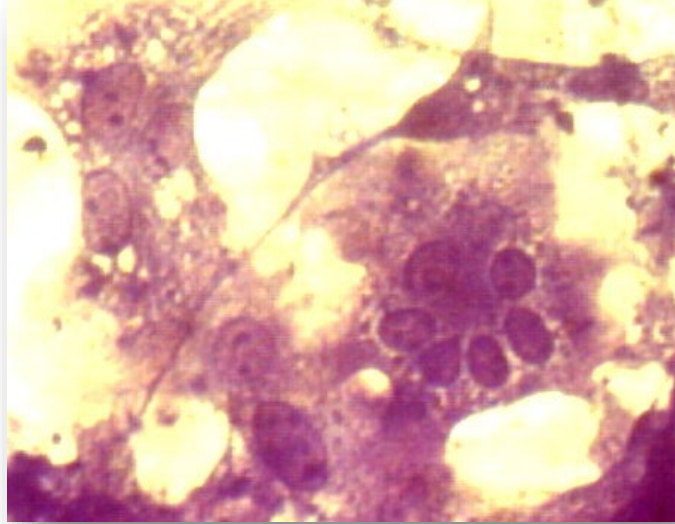
الصورة رقم (1) توضح كيفية قياس حجم الورم بأستعمال آلة Vernier Calipers

النتائج

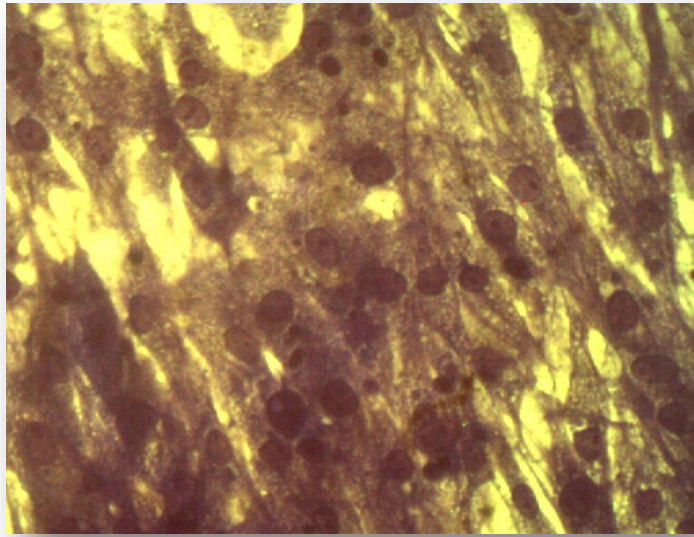
. فايروس النيوكاسل Newcastle disease virus

A. عزل وتنمية فايروس النيوكاسل

أظهر السائل الألتوي المحصود من بيض الدجاج النامي الهالك وذلك بعد 48-72 ساعة من حقن العالق المحضر من النموذج المرضي نتيجة تفاعل إيجابية في اختبار التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج على شكل شبكة دموية بمعيار 16 HAU ، وأعطى السائل الألتوي للتمرير الثاني في أجنة البيض نتيجة موجبة بمعيار 512 HAU في اختبار التلازن الدموي ، ووصل معيار الفايروس عند التمرير الثالث 2048 HAU وحدة تلازنية ، وتم المحافظة على معيار ثابت للفايروس عن طريق التمرير المتتالي في البيض ولغاية التمرير السابع عند نهاية التجربة. كما اظهر تنمية الفايروس على مزرعة ارومة الخلايا الليفية لاجنة بيض الدجاج المميزات الخاصة بفايروس النيوكاسل من حيث وجود ضاهرة الاندماج الخلوي وتكون الخلايا العملاقة متعددة الانوية نتيجة لعمل بروتين الاندماج الخاص بالفايروس الذي يؤدي الى التحام الخلايا المصابة ببعضها وكما في الصور 2 و 3



الصورة 2- تكون الخلايا متعددة الانوية الناتجة من التحام الخلايا المصابة بفايروس النيوكاسل في المزرعة الاولية لاجنة الدجاج



الصورة 3- خلايا السيطرة في المزرعة الاولية لاجنة الدجاج الغير مصابة بالفايروس ونلاحظ عدم وجود الخلايا العملاقة متعددة الانوية

B. تصوير فايروس النيوكاسل بالمجهر الإلكتروني

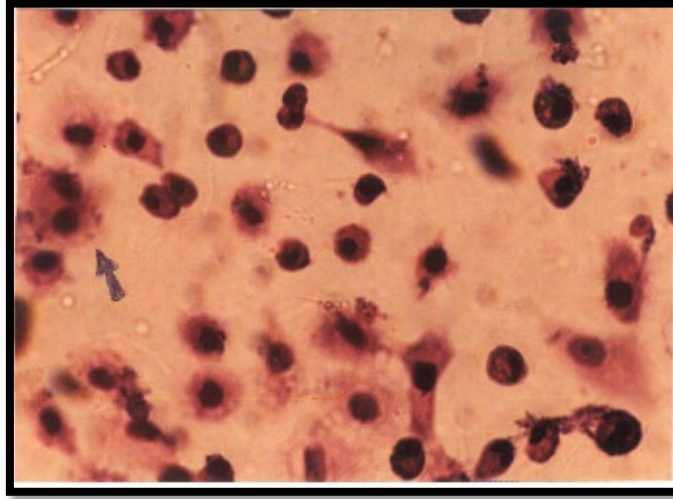
بين فحص السائل الألتوي المستعمل في العلاج احتواءه على جزيئات الفايروس بشكله الكروي أو شبه الكروي بقطر يتراوح من 197-345 نانوميتر وبمعدل 271 نانوميتر .

C. اختبار السمية الخلوية لفايروس النيوكاسل على الخلايا السرطانية في الزجاج Newcastle disease virus cytotoxicity test on tumor cells *in vitro*

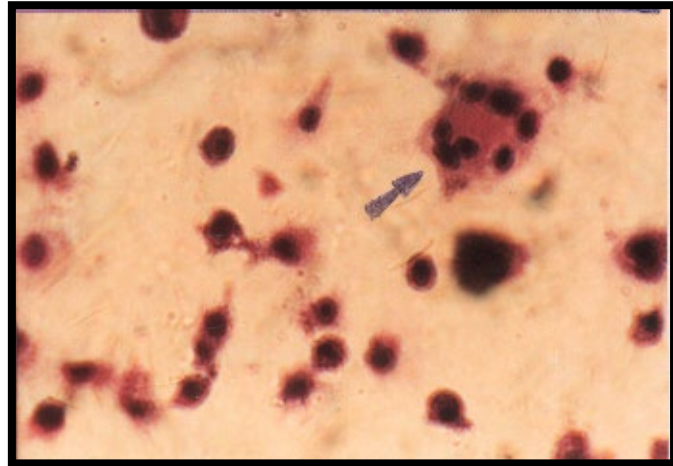
أوضحت النتائج أن لفايروس النيوكاسل تأثير محطم على خلايا خط Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري لغاية التخفيف العشري الرابع 10^{-4} وعلى خط خلايا RD لسرطان العضلة البشري لغاية التخفيف العشري الرابع 10^{-4} وعلى خط خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفئري لغاية التخفيف العشري الخامس 10^{-5} وعلى سرطان الدماغ البشري ولغاية التخفيف الخامس.

D. التأثير المحلل لفايروس النيوكاسل على الخلايا السرطانية في الزجاج
1. الدراسة بالمجهر الضوئي

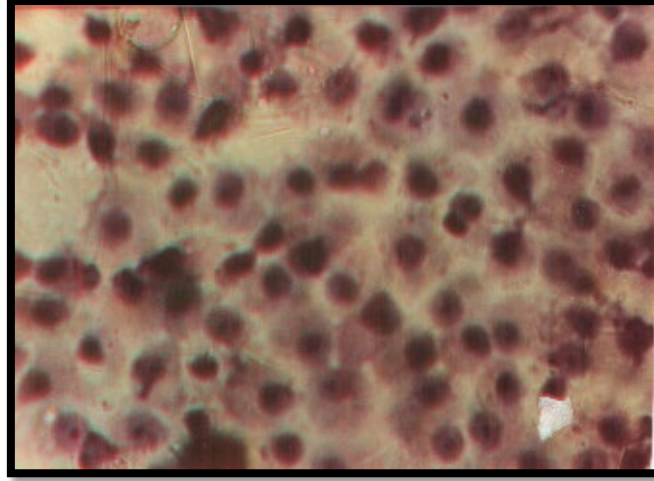
أظهر الفايروس قابلية عالية على التكاثر وتحطيم جميع الخطوط للخلايا السرطانية البشرية والفاربية فمنذ 24 ساعة الأولى من حقن الفايروس (256×10^{-1} HAU) تكونت بؤر من خلايا مستديرة الشكل وغامقة اللون ذات نواة غير مركزية ولوحظ التزايد في التأثير المحلل للخلايا السرطانية بفعل الفايروس ولغاية 72 ساعة من الإصابة حيث نلاحظ تكون ظاهرة الالتحام Syncytia وتكون الخلايا العملاقة متعددة الأنوية والناجمة من التحام الخلايا بفعل بروتين الالتحام F لفايروس النيوكاسل. أما خلايا مجموعة السيطرة غير المحقونة بالفايروس فلم يطرأ عليها أي تغيير.



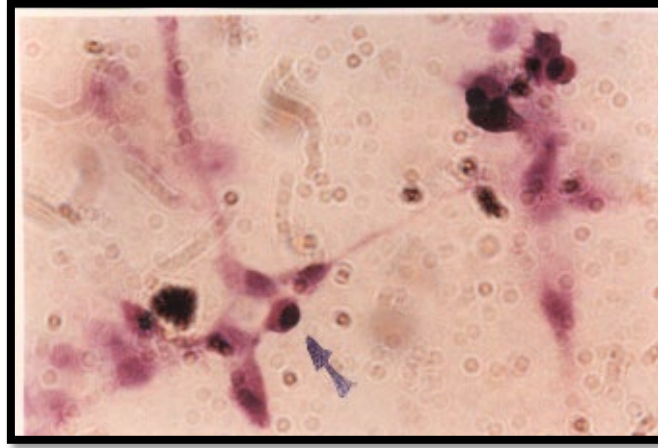
الصورة رقم (4) خلايا خط HEP-2 لسرطان الحنجرة البشري المحقونة بفايروس النيوكاسل العترة المحلية ويلاحظ فعل الفايروس المحطم والحال للخلايا السرطانية مع تكون الخلايا المستديرة والغامقة اللون ذات النواة غير المركزية ووجود ظاهرة الاندماج (السهم) (H& E) (200 X)، وذلك بعد 72 ساعة من حقن الفايروس.



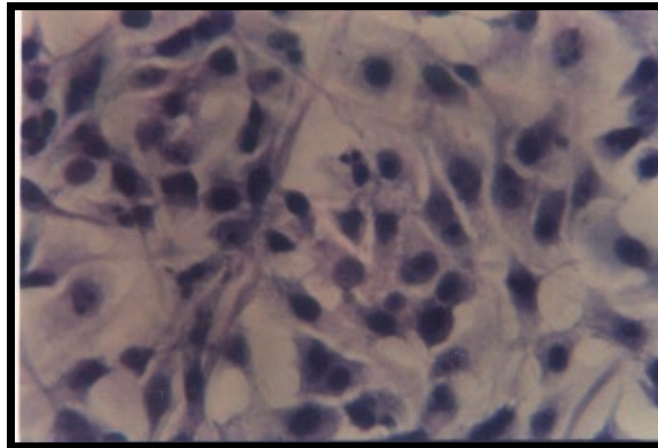
الصورة رقم (5) تبين ظاهرة الاندماج Syncytia في خلايا HEP-2 لسرطان الحنجرة (H& E) (400 X)، وذلك بعد 72 ساعة من حقن الفايروس.



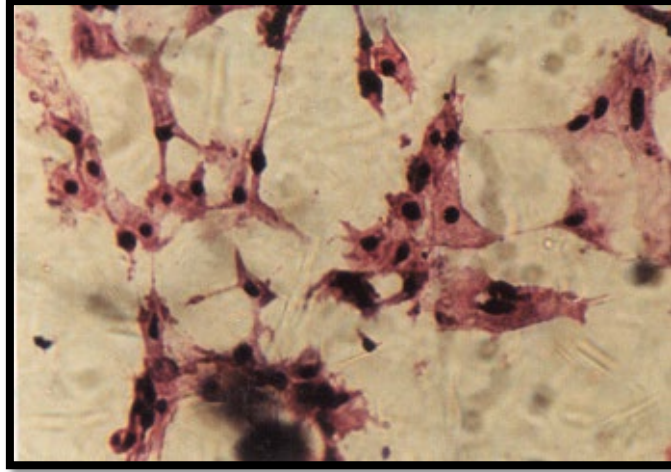
الصورة رقم (6) خلايا خط HEP-2 لسرطان الحنجرة البشري لمجموعة السيطرة غير المحقونة (H&E) (200 X).



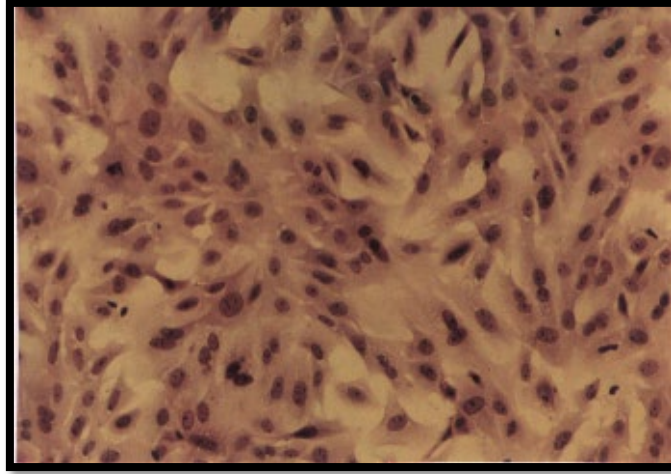
صورة رقم (7) خلايا RD لسرطان العضلة البشري والمصابة بفيروس النيوكاسل بعد 72 ساعة من الإصابة ويلاحظ تكون الخلايا الدائرية ذات النواة الجانبية (السهم) (H&E) (200 X)، وذلك بعد 72 ساعة من حقن الفيروس.



صورة رقم (8) خلايا RD لسرطان العضلة البشري لمجموعة السيطرة غير المحقونة بالفيروس (H&E) (200 X).

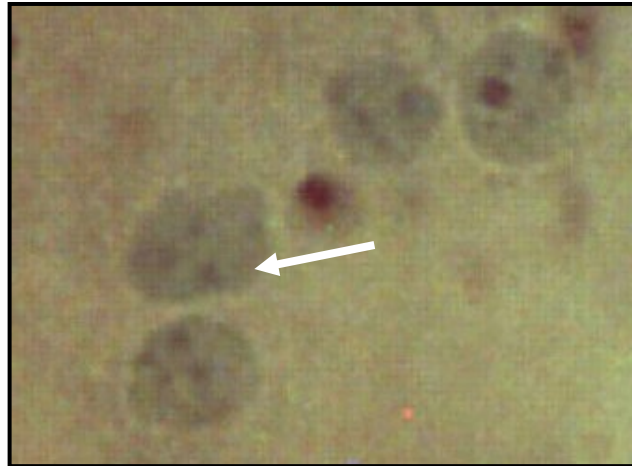


صورة رقم (9) توضح الفعل الحال للورم لعنزة فايروس النيوكاسل المحلية على خلايا خط AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفثرية بعد 72 ساعة من الاصابة (H&E) (200 X).

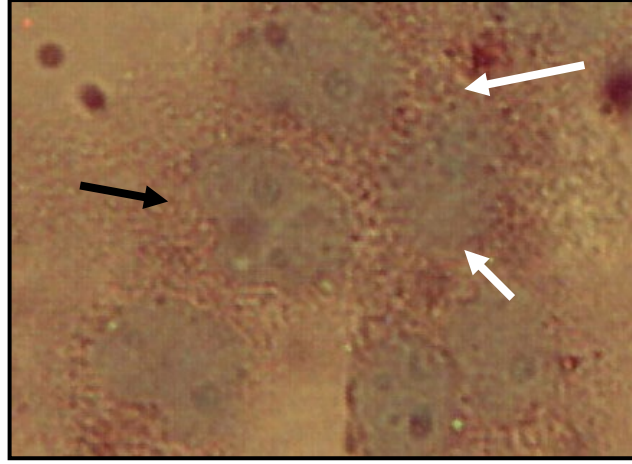


صورة رقم (10) خلايا خط AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفثرية لمجموعة السيطرة غير المحقونة بالفايروس (H&E) (200 X).

كما اثبتت الدراسة بالمناعه النسيجية الخلوية باستعمال اجسام مضاده احادية النسييله متخصصة للمستضد الفايروسي HN لفايروس النيوكاسل العنزة العراقية ان الفايروس تضره مستضداته على سطح الخلية السرطانية وذلك للاصطباج الموجب وكما تضره الصور ادناه:



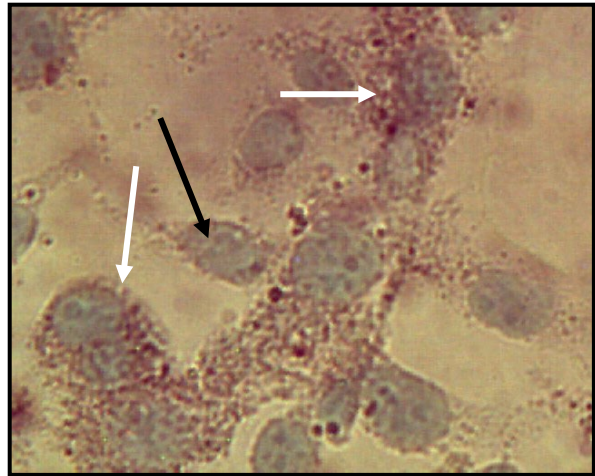
صورة رقم 11 وهي لمجموعة السيطرة غير المصابة بفايروس النيوكاسل لخلايا سرطان الحنجرة ال Hep-2 حيث نلاحظ عدم اصطباج الهيولي باي صبغه ونشاهد الانوية واضحة فقط.



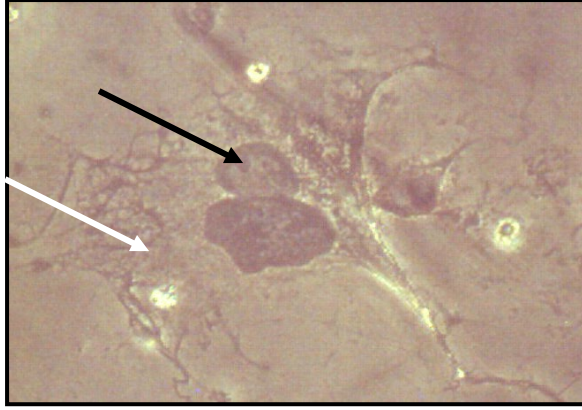
صورة رقم 12 ونلاحظ اصطبغ الهيولي باللون البني (الاسهم البيضاء) لخلايا سرطان الحنجرة المصابة بفايروس النيوكاسل العنزة العراقية وهذا يعني تواجد مستضد الفايروس الHN على سطح الخلايا السرطانية وهذا دليل مهم على تكاثر الفايروس داخل الخلايا السرطانية وتصنيع بروتيناته داخل الخلية و غرسها على سطح الخلايا السرطانية وهي خطوة مهمة لتغيير السطح المستضدي. السهم الاسود يشير الى النواة. 400x



صورة رقم 13 وهي لمجموعة السيطرة غير المصابة بفايروس النيوكاسل لخلايا سرطان الخلية العضلية ال RD حيث نلاحظ عدم اصطبغ الهيولي باي صبغه (السهم الابيض) ونشاهد الانوية واضحة فقط (السهم الاسود).



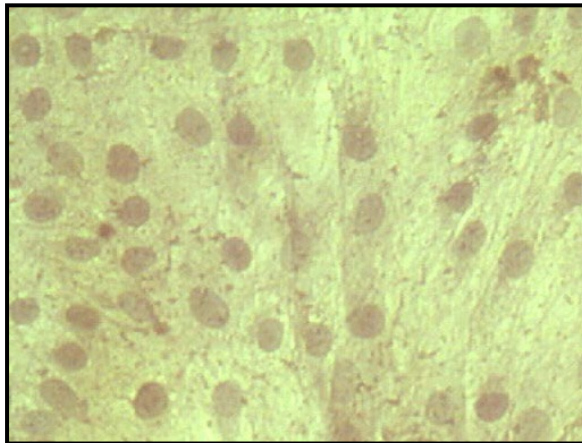
صورة رقم 14 وهي لمجموعة الخلايا المصابة بفايروس النيوكاسل لخلايا سرطان العضله ال RD حيث نلاحظ اصطبغ الهيولي بصبغه بنية (السهم الابيض) ونشاهد الانوية واضحة (السهم الاسود).



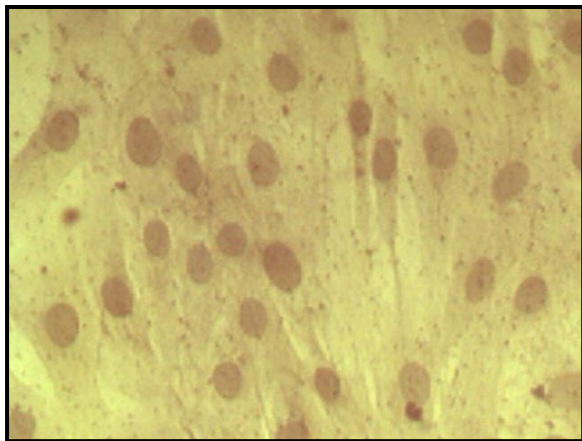
صورة رقم 15 خلايا سرطان الدماغ ال
Glioblastoma الغير مصابة بفايروس النيوكاسل
ونلاحظ عدم اصطبغ الهيولي (السهم الابيض) والنواة
مؤشرة بالسهم الاسود



صورة رقم 16 خلايا سرطان الدماغ ال
Glioblastoma المصابة بفايروس النيوكاسل ونلاحظ
اصطبغ الهيولي باللون البني (السهم الابيض)



صورة رقم 17 وهي للخلايا الطبيعية لجنين الجرذ
والخلايا غير مصابة بالفايروس



صورة رقم 18 لخلايا جيني الجرذ الطبيعية المصابة بفايروس
النيوكاسل ونلاحظ عدم وجود الخلايا البنية الموجبة وهذا يدل
على عدم قدرة الفايروس على التكاثر في الخلايا الطبيعية

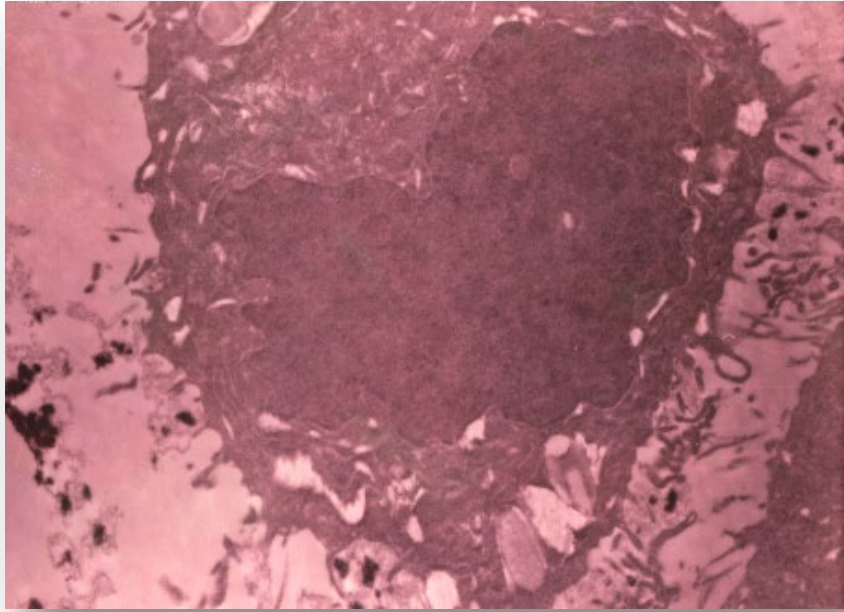
2. نتائج الدراسة فوق المجهرية

1. الدراسة فوق المجهرية لخلايا Hep-2 المصابة بفايروس النيوكاسل

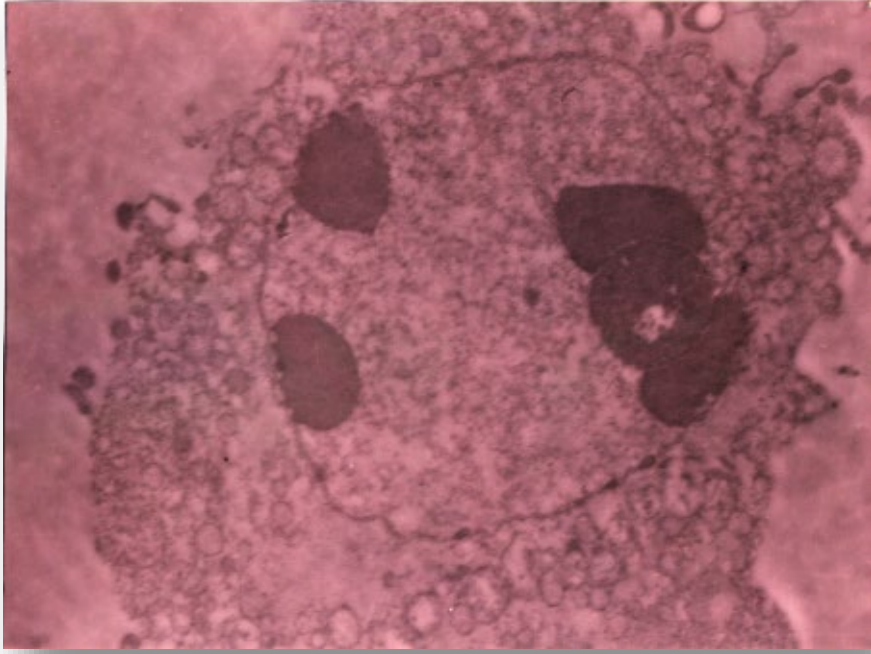
وضّحت نتائج الفحص فوق المجهرية تبرعم الفايروس بكثافة من الخلايا السرطانية وتحطم أغلب الخلايا السرطانية التي لا تظهر أشكالاً طبيعية (الصورة رقم 19) والتي أحدث فايروس النيوكاسل ظاهرة الموت المبرمج في بعضها حيث يلاحظ تكوّن الكروماتين المتكثف في محيط النواة (الصورة رقم 20) وأظهر الفايروس المتبرعم أشكالاً دائرية وبيضوية وخطية توجد على سطح الخلايا السرطانية (الصورة رقم 21) وأن مناطق التبرعم غير متخصصة بمكان معين على سطح الخلية السرطانية. تراوح قطر الفايروس ذو الأشكال الكروية أو شبه الكروية (208-291 نانومتر، بمتوسط 242.1 نانومتر) أما الأشكال الخطية فقد يصل طولها (357-1138 نانومتر، بمتوسط 679.8 نانومتر). كما وجد أن سمك المحفظة لفايروس النيوكاسل يصل ما بين 20.8 إلى 18.7 (الصورة رقم 22).

2. الدراسة فوق المجهرية لخلايا RD المصابة بفايروس النيوكاسل

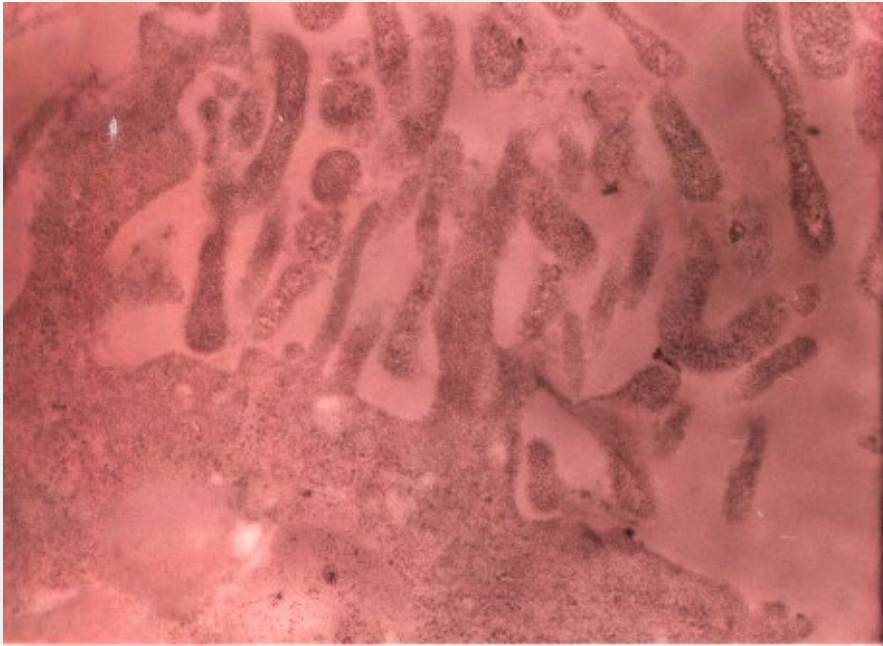
بينت نتائج الفحص فوق المجهرية تبرعم الفايروس بكثافة من جميع الخلايا مع وجود أشلاء الخلايا المتحللة بفعل الفايروس مع وجود خلايا تعاني من النخر وظاهرة الاندماج (الصورة رقم 23)، مقارنة مع الخلايا الطبيعية (الصورة رقم 24) كما أظهر الفايروس المتبرعم أشكالاً كروية وبيضوية وخطية توجد على سطح الخلايا السرطانية (الصورة رقم 25). كما أن مناطق التبرعم غير متخصصة بمكان معين في الخلايا السرطانية. وقد يصل قطر الفايروس ذو الأشكال الكروية وشبه الكروية (296-156.6 نانومتر، بمتوسط 192.6 نانومتر) أما الأشكال الخطية فقد تصل إلى (715.4-260 نانومتر) كما يصل سمك المحفظة إلى (20.8-12.5 نانومتر).



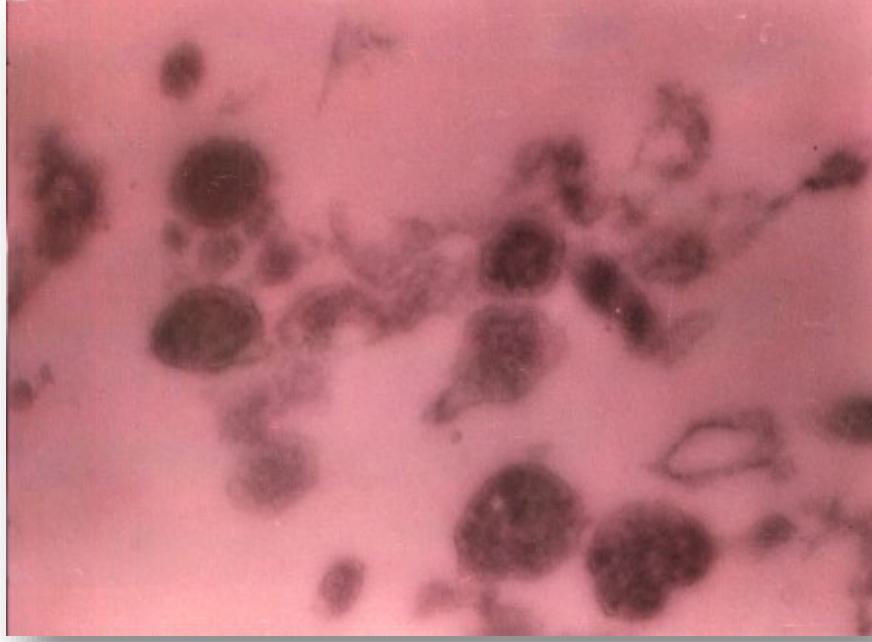
الصورة رقم (19) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط Hep-2 لسرطان الحنجرة البشري توضح تحطم الخلية السرطانية وتبرعم فايروس النيوكاسل من سطحها (خلايا اليورانيل وسترات الرصاص X-6200).



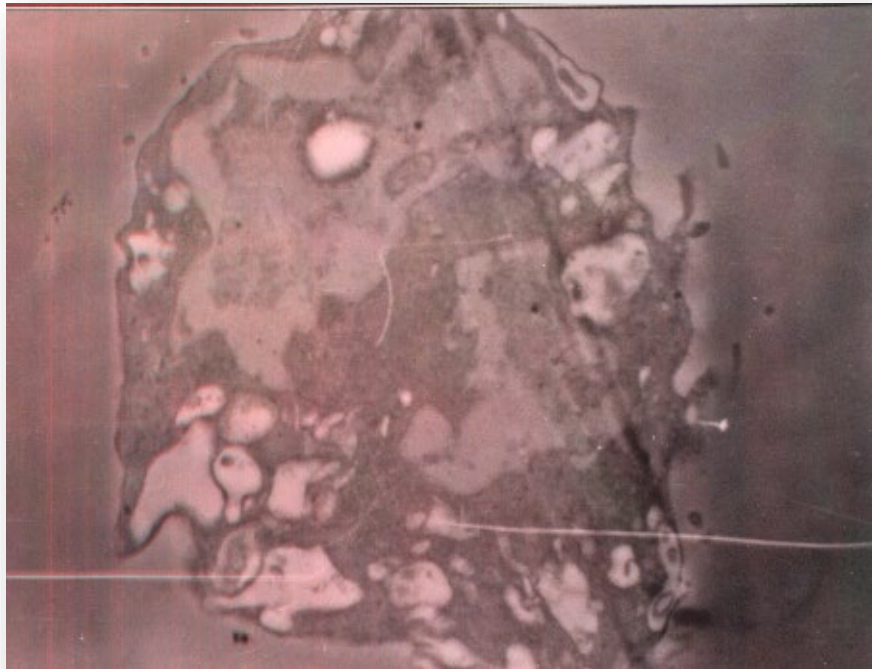
الصورة رقم (20) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط HEP-2 لسرطان الحنجرة البشري توضح وجود خلية تعاني من ظاهرة الموت المبرمج (Apoptosis) حيث يلاحظ تكور الكروماتين المتكثف في محيط النواة (خلايا اليورانيل وسترات الرصاص - 8700X) .



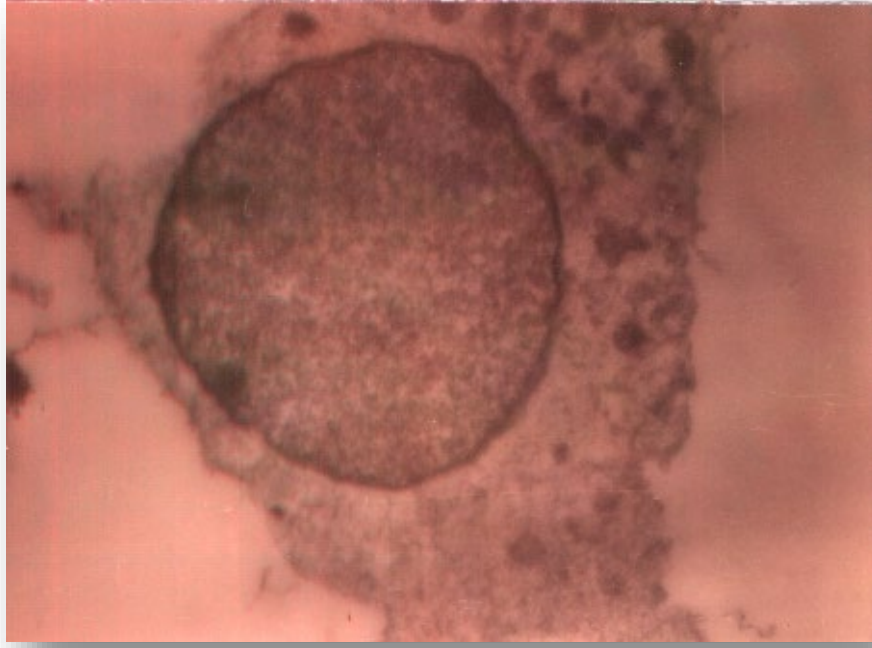
الصورة رقم (21) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط HEP-2 لسرطان الحنجرة البشري تظهر تبرعم فايروس النيوكاسل من الغشاء البلازمي ذي الاشكال الخيطية والكروية (خلايا اليورانيل وسترات الرصاص - 41000 X) .



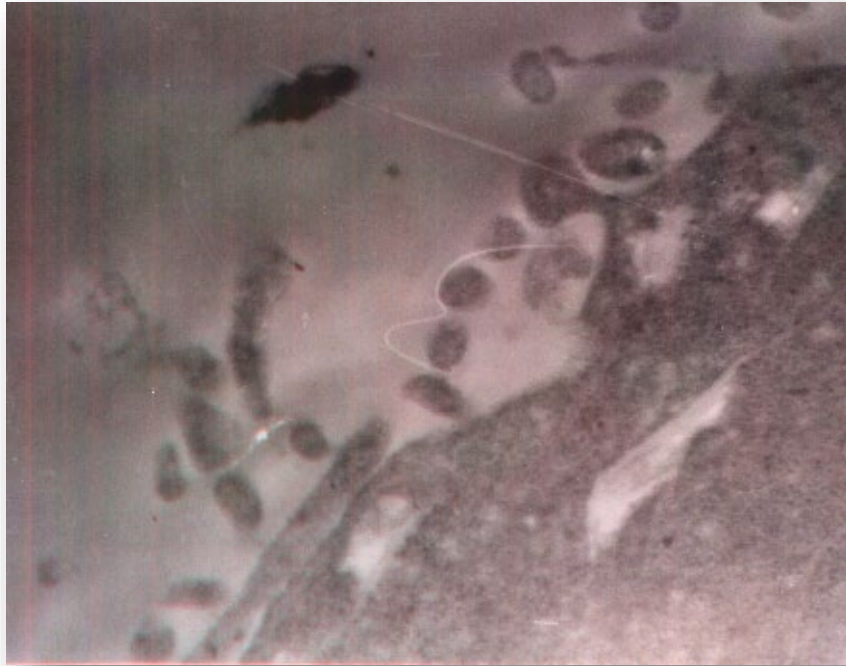
الصورة رقم (22) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط-2 HEP لسرطان الحنجرة البشري تظهر الفايروس المتبرعم من الغشاء البلازمي ذي الاشكال الكروية وشبه الكروية (بقطر 208-291 نانوميتر) سمك المحفظة (18.7-20.8 نانوميتر) (خلايا اليورانييل وسترات الرصاص X61000) .



الصورة رقم (23) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط RD لسرطان العضلة البشري المصابة بعثرة فايروس النيوكاسل المحلية وتلاحظ ضاهرة الاندماج Syncytia ونلاحظ تنخر الخلايا (خلايا اليورانييل وسترات الرصاص - X16000) .



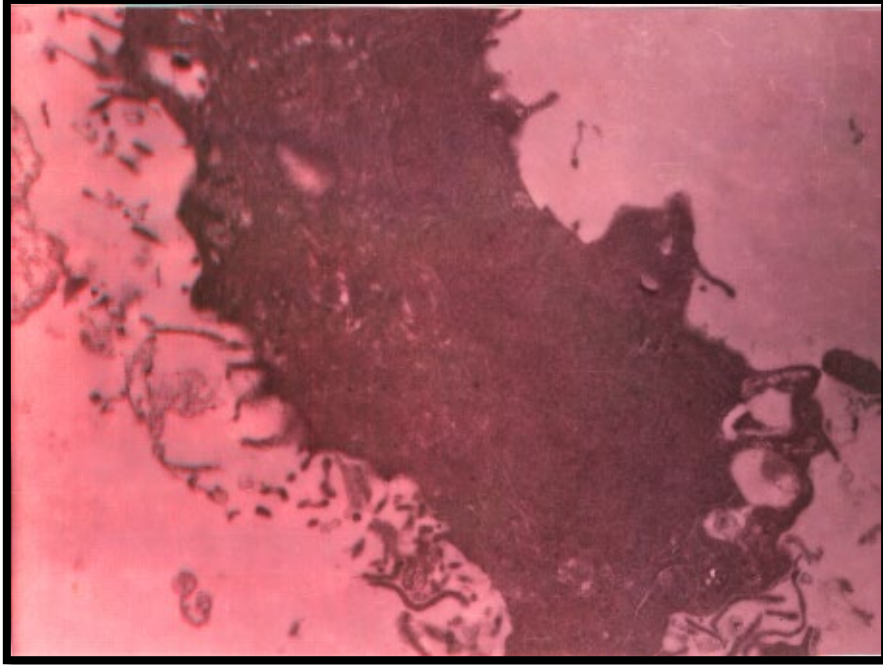
الصورة رقم (24) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط RD لسرطان العضلة البشري لمجموعة السيطرة غير المصابة (خلايا اليورانيل وسترات الرصاص- 8700 X)



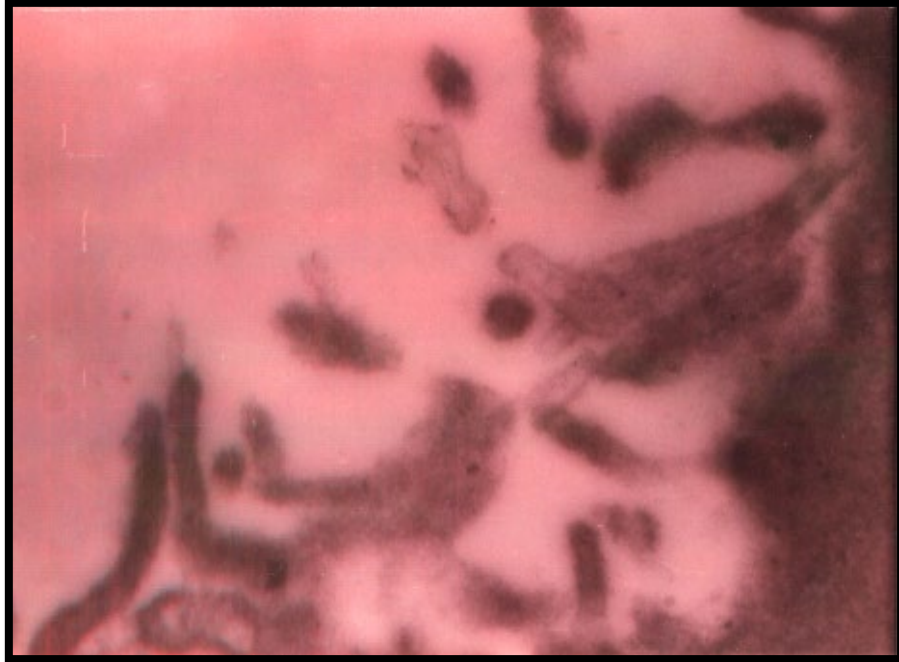
الصورة رقم (25) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط RD لسرطان العضلة البشري تظهر الفايروس المـتبرعم من الغشاء البلازمي ذي الاشكال الكروية وشبه الكروية (قطر 156.6- 291.6 نانوميتر) سمك المحفظة (18.7-20.8 نانوميتر) (خلايا اليورانيل وسترات الرصاص- 64000X) .

3. الدراسة فوق المجهرية لخلايا AMN3 المصابة بفايروس النيوكاسل

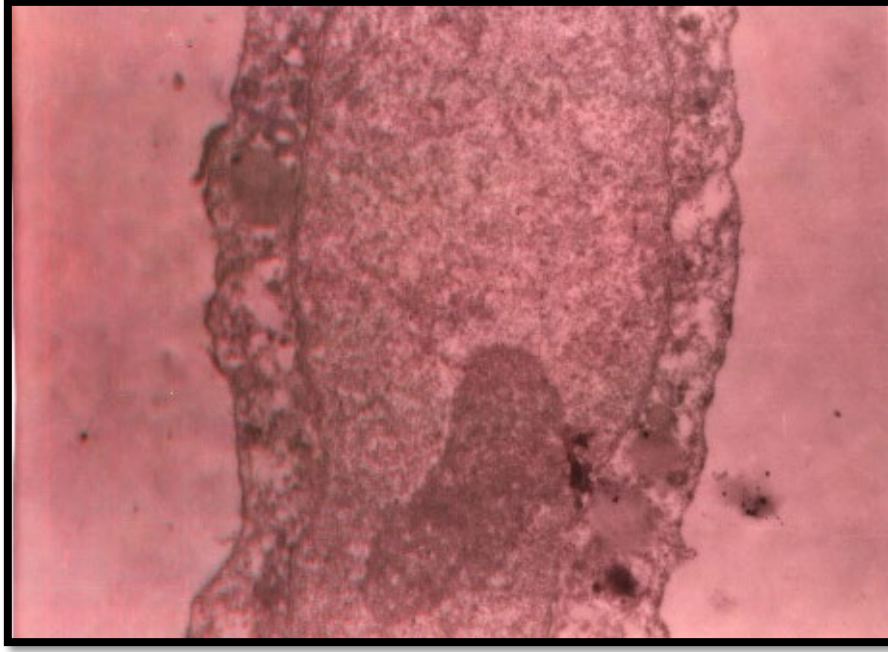
أوضحت نتائج الفحص فوق المجهرية تبرعم الفايروس بكثافة من جميع الخلايا المفحوصة مع تحطم الخلايا السرطانية (الصورة رقم 26) ولوحظ وجود الفايروس بأشكاله الكروية والبيضوية والخييطية (الصورة رقم 27) وقد تراوح قطر الفايروس (145-187.5 نانوميتر) وتراوحت أطوال الأشكال الخييطية (1041.6-1416.6 نانوميتر، بمتوسط 743 نانوميتر) وقد وصل سمك المحفظة الى (14.5-18.7 نانوميتر) مع ملاحظة الخلايا الطبيعية (الصورة رقم 28).



الصورة (26) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبينية ويشاهد تبرعم الفايروس بكثافة من الغشاء البلازمي وتعاني الخلية من النخر، (خلايا اليورانييل وسترات الرصاص - 8700X).



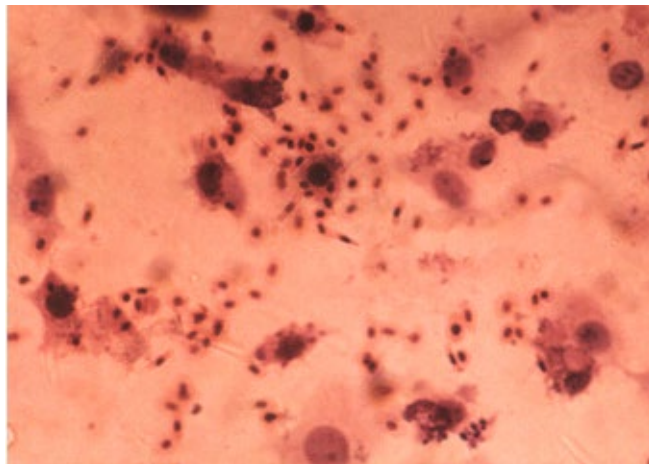
الصورة رقم (27) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط AMN3 لسرطان الغدة اللبينية تظهر الفايروس المتبرعم من الغشاء البلازمي ذي الأشكال الكروية وشبه الكروية (قطر 145-187.5 نانوميتر) و ذي الأشكال الخييطية (بطول 1041.6-416.6 سمك المحفظة (خلايا اليورانييل وسترات الرصاص - 64000 X) .



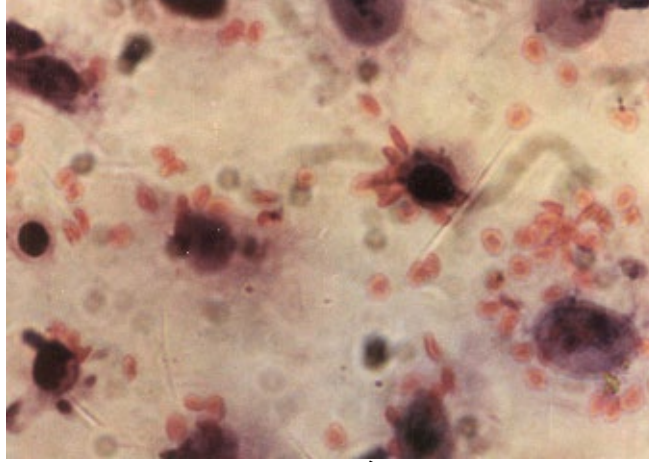
الصورة رقم (28) بالمجهر الالكتروني النافذ لخلايا خط AMN3 لسرطان الغدة اللبنية الفأرية لمجموعة السيطرة غير المصابة (خلايا اليورانيل وسترات الرصاص - 8700X) .

4. اختبار الامتزاز الدموي Hemadsorption test

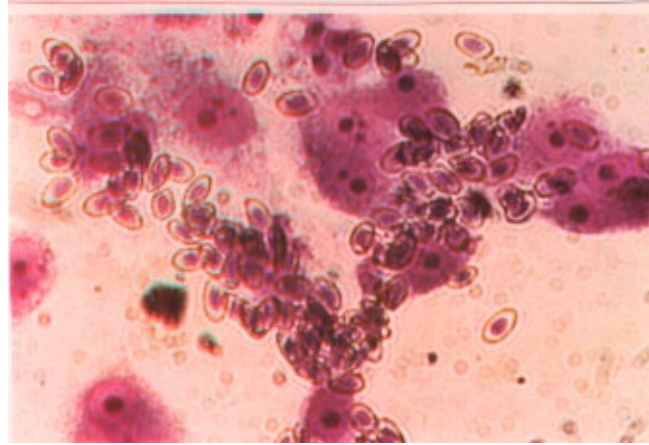
أوضحت نتائج الاختبار أن جميع أنواع خطوط الخلايا السرطانية المصابة بفايروس النيوكاسل بعد 20 ساعة من الحقن (256 HAU) أظهرت قابلية عالية على التلازن مع كريات الدم الحمر . إذ أظهرت الخلايا السرطانية لسرطان الحنجرة Hep-2 والسرطان العضلي RD البشريتين المصابتين التصاقا وتجمعا كثيفا للخلايا الحمر حولهما (الصورة رقم 29,30,31,32) . أما خلايا السيطرة المعاملة بالطريقة نفسها فلم يظهر عليها أي تجمع لكريات الدم الحمر (الصورة رقم 33,34) . وأظهرت خلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفترية التصاقا وتجمعا كثيفا للخلايا الحمر الفترية وللدواجن حول الخلايا المصابة (الصورة رقم 35) على حين لم يلاحظ أي تجمع لكريات الدم الحمر حول خلايا السيطرة (الصورة رقم 36)



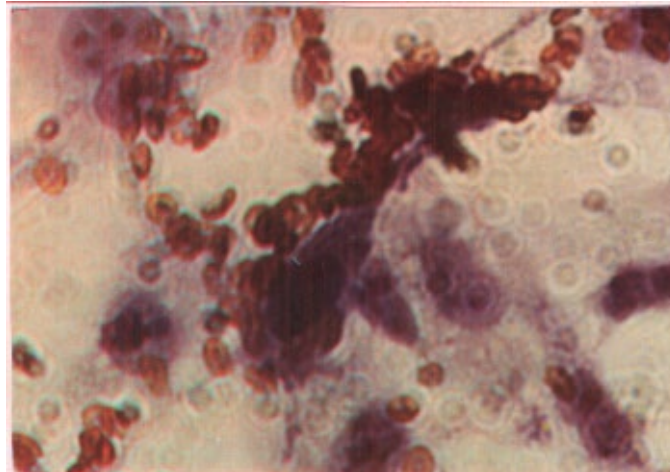
الصورة رقم (29) توضح اختبار الامتزاز الدموي في خط خلايا HEP-2 لسرطان الحنجرة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (أستخدام كريات الدم الحمر للدجاج) (H&E) (200 X)



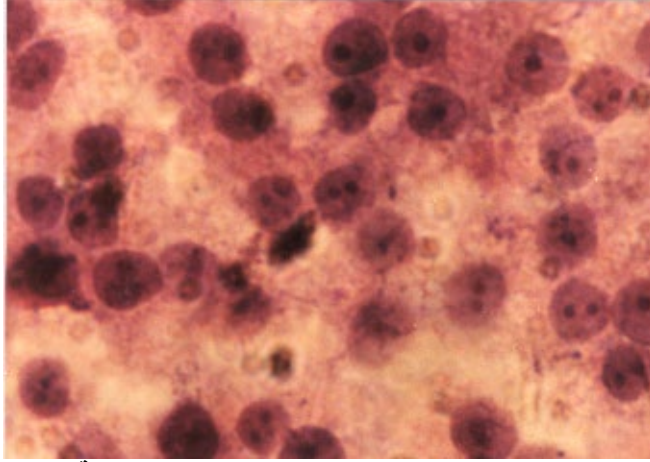
الصورة رقم (30) توضح اختبار الامتزاز الدموي في خط خلايا HEP-2 لسرطان الحنجرة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (أستخدام كريات الدم الحمر البشرية) (H&E) (400 X).



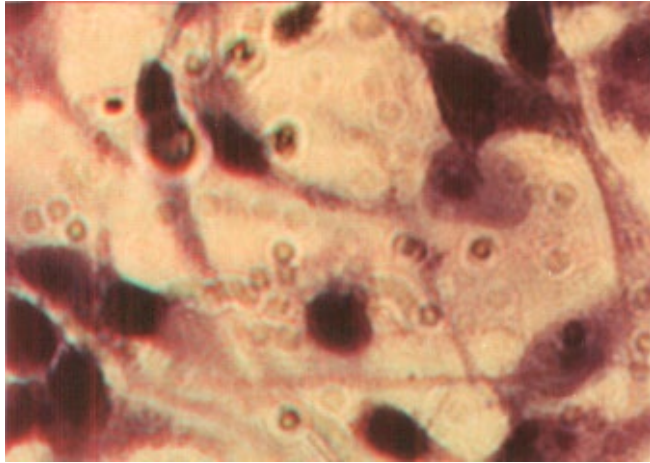
الصورة رقم (31) توضح اختبار الامتزاز الدموي في خط خلايا RD لسرطان العضلة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (أستخدام كريات الدم الحمر للدجاج) (صبغة كمزا) (200 X).



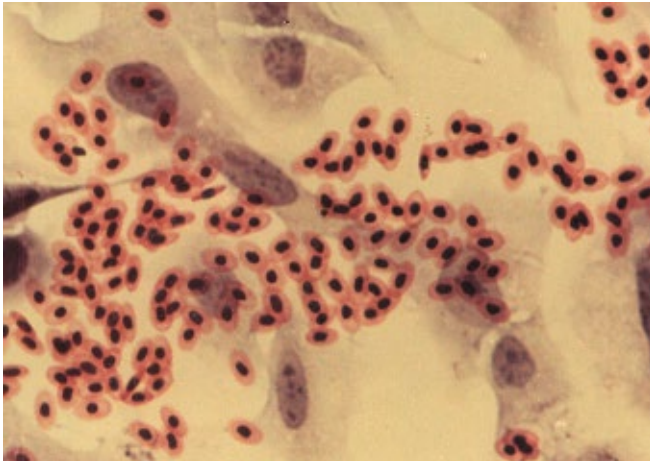
الصورة رقم (32) توضح اختبار الامتزاز الدموي في خط خلايا RD لسرطان العضلة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (أستخدام كريات الدم الحمر البشرية) (H&E) (400 X).



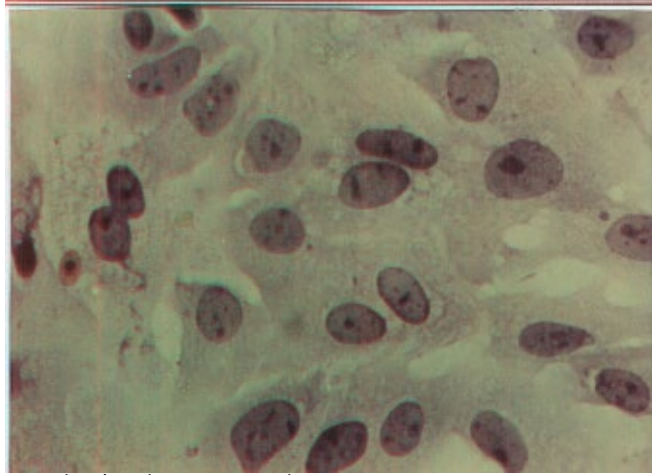
الصورة رقم (33) توضح خلايا خط HEP-2 لسرطان الحنجرة غير المحقونة / مجموعة السيطرة لاختبار الامتزاز الدموي (H&E) (400 X).



الصورة رقم (34) توضح خلايا خط RD لسرطان العضلة غير المحقونة / مجموعة السيطرة لاختبار الامتزاز الدموي (H&E) (400 X).



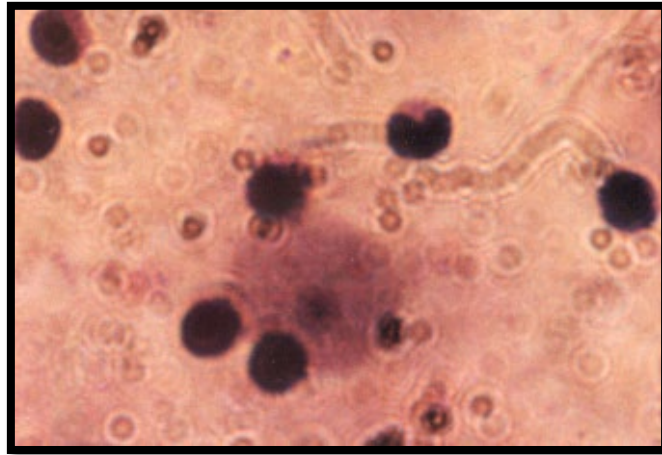
الصورة رقم (35) توضح اختبار الامتزاز الدموي في خط خلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفأرية وذلك بعد 20 ساعة من حقن عترة فايروس النيوكاسل المحلية (أستخدام كريات الدم الحمر للدجاج) (H&E) (400 X).



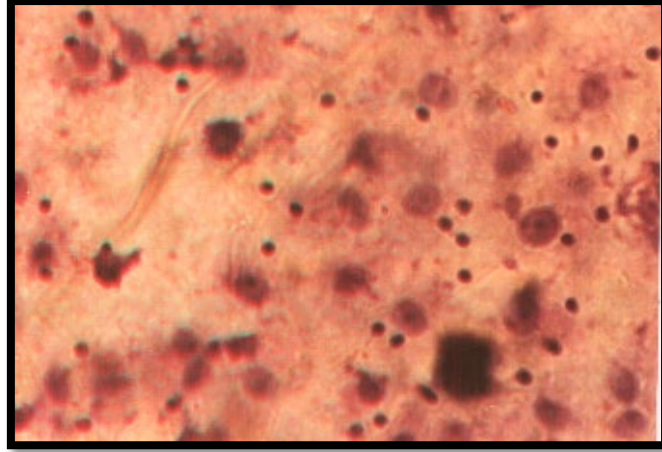
الصورة رقم (36) توضح خط خلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفأرية غير المحقونة / مجموعة السيطرة لاختبار الامتزاز الدموي (H&E) (400 X) .

6.4.4. اختبار التصاق الخلايا اللمفاوية Lymphocyte adhesion assay

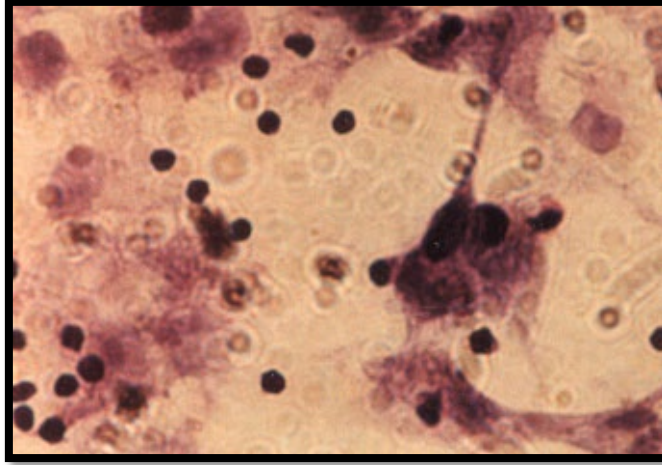
أوضحت نتائج الاختبار التصاقا واضحا وكثيفا للخلايا اللمفاوية البشرية على خلايا سرطان الحنجرة HEP-2 وسرطان العضلة RD المصابة بفيروس النيوكاسل (الصور رقم 37,38,39,40) على حين لم يظهر أي التصاق يذكر للخلايا اللمفاوية على الخلايا السرطانية البشرية غير المصابة بالفايروس (الصورتان رقم 41,42) . كما بينت نتائج الاختبار على خلايا سرطانة الغدة اللبنية وسرطان الخلية البلازمية الفئريين التصاقا واضحا وكثيفا للخلايا اللمفاوية على الخلايا السرطانية المصابة (الصورتان رقم 43,44) مقارنة مع خلايا السيطرة غير المصابة التي لم تظهر أي التصاق يذكر (الصورة رقم 45).



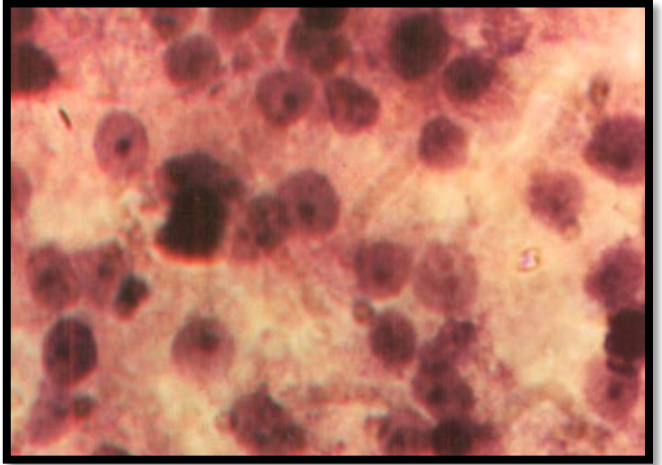
الصورة رقم (37) توضح التصاق الخلايا اللمفاوية البشرية (لذكر) على سايتوبلازم خلية من خط خلايا HEP-2 لسرطان الحنجرة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (H&E) (1000 X) .



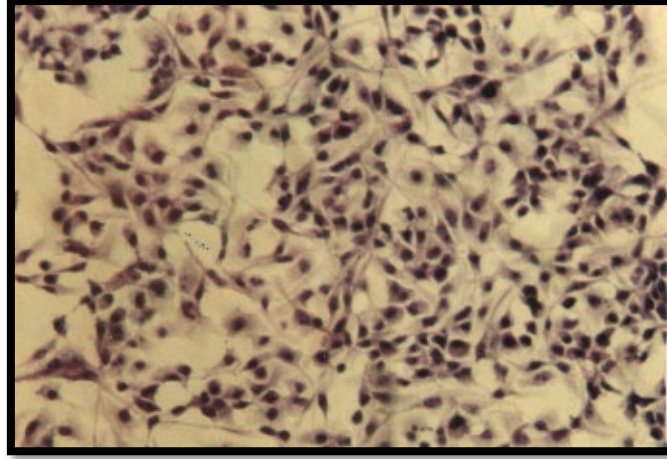
الصورة رقم (38) توضح الاتصاق الكثيف للخلايا اللمفاوية البشرية (لذكر) على خط خلايا HEP-2 لسرطان الحنجرة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (H&E) (X 200) .



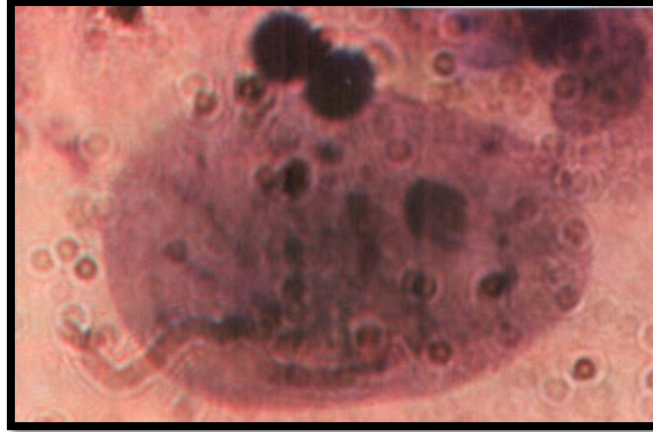
الصورة رقم (39) توضح التصاق الخلايا اللمفاوية البشرية (لأنثى) على سايتوبلازم خلية من خط خلايا RD لسرطان العضلة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (H&E) (X 200) .
صورة رقم (40) توضح التصاق كثيف للخلايا اللمفاوية البشرية (لأنثى) على خط خلايا RD لسرطان العضلة وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (H&E) (X 200) .



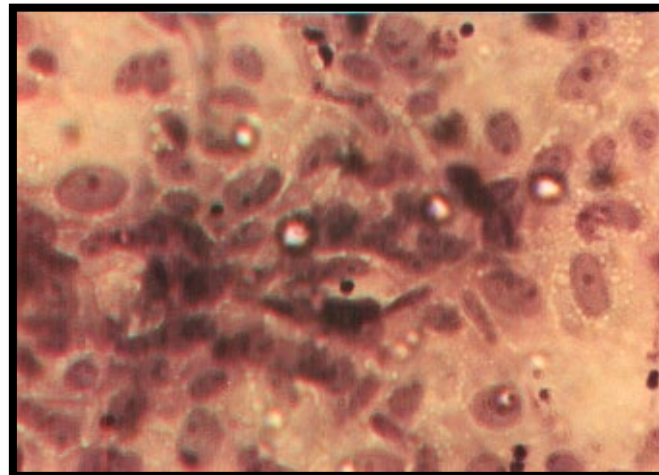
صورة رقم (41) توضح خلايا خط HEP-2 لسرطان الحنجرة غير المحقونة / مجموعة السيطرة لاختبار التصاق الخلايا اللمفاوية (H&E) (X 400) .



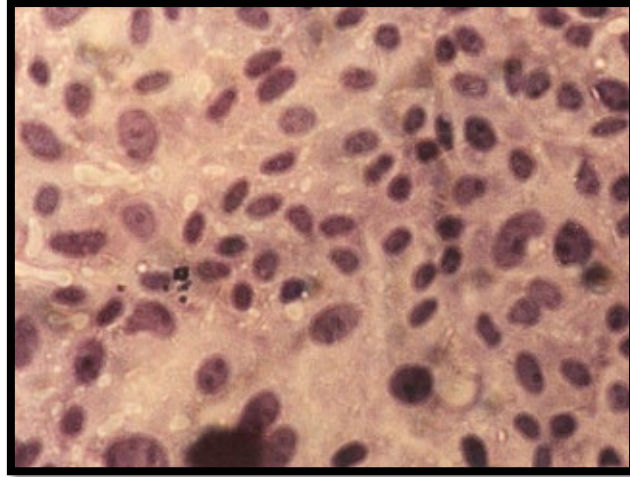
الصورة رقم (42) توضح خلايا خط RD لسرطان العضلة غير المحقونة / مجموعة السيطرة لاختبار التصاق الخلايا للمفاوية (H&E) (100 X).



الصورة رقم (43) توضح التصاق الخلايا للمفاوية الفأرية (لأنثى) على سايتوبلازم خلية من خط خلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفأرية وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (H&E) (1000 X).



الصورة رقم (44) تظهر التصاق واضح للخلايا للمفاوية الفترية (لأنثى) على خط خلايا AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفأرية وذلك بعد 20 ساعة من حقن فايروس النيوكاسل العترة المحلية (H&E) (200 X).

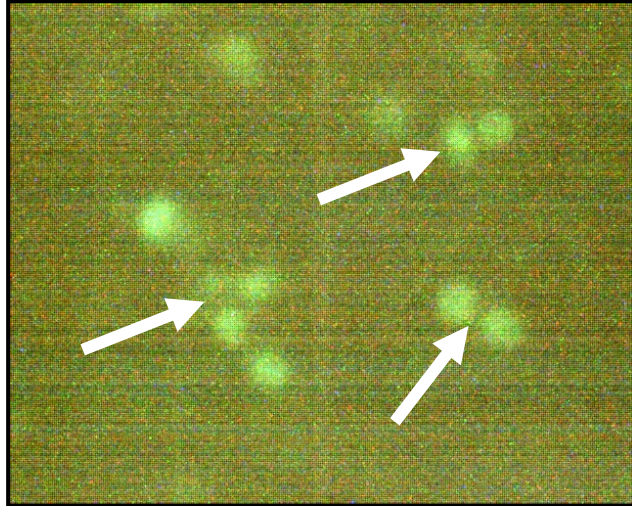


الصورة رقم (45) توضح خلايا خط AMN3 لسرطانة الغدة اللبنية الفأرية الغير محقونة / مجموعة السيطرة لاختبار التصاق الخلايا اللمفاوية (H&E) (200 X).

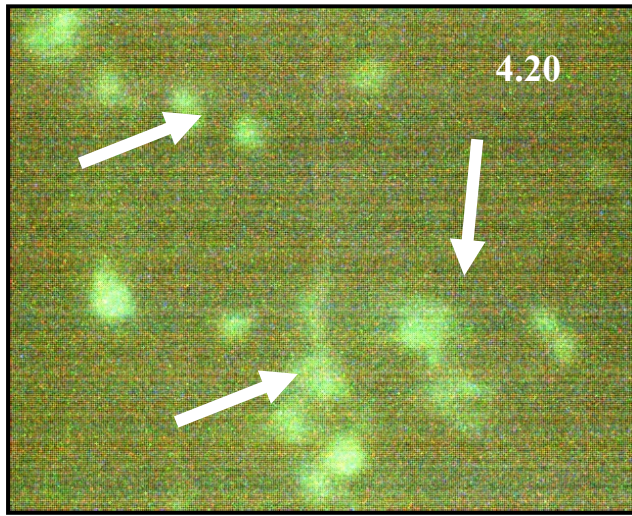
دراسة نوع الخلايا المناعية التي تميز الخلايا السرطانية المصابة بفيروس النيوكاسل وتمت هذه التجربة لمعرفة نوع الخلايا المناعية الملتصقة على الخلايا السرطانية المصابة بفيروس النيوكاسل من التجارب السابقة، وتم ذلك باستخدام اجسام مضادة احادية النسيلة مزدوجة متخصصة لمستضد الخلايا التائية المساعدة وهو CD4 وهو مرتبط بصبغه متألقة حمراء ولمستضد الخلايا التائية السامة وهو CD8 مرتبط بصبغه خضراء متألقة mouse anti human CD8:FITC/CD4:RPE واضهرت النتائج ان كلا النوعين يلتصقان على الخلايا المصابة في حين لا يرتبطان على الخلايا غير المصابة (جدول رقم 1) مما يشير الى وجود عامل مساعد وهو مستضدات فايروس النيوكاسل التي تظهر على سطح الخلايا الورمية بعد الاصابة (صورة رقم 47,46 و48).

جدول رقم 1 ويظهر نسب الخلايا الملتصقة على سطح الخلايا الورمية

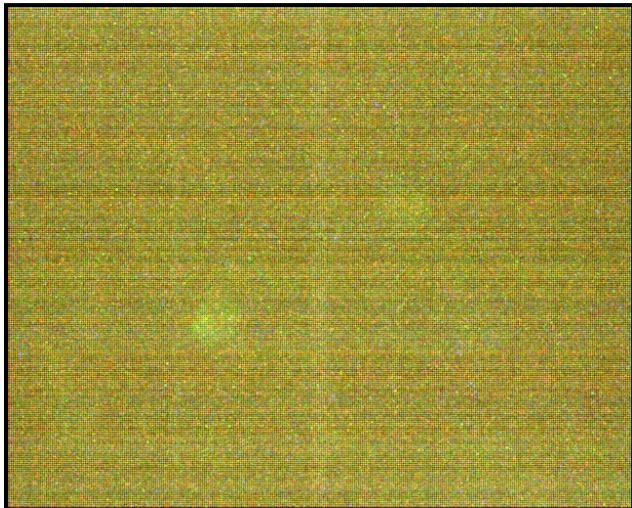
Tumor cells		percentage of attached CD8	percentage of attached CD4
Hep-2 سرطان الحنجرة	المصابة	48%	52%
	غير المصابة	-	-
RD سرطان العضله	المصابة	51%	49%
	غير المصابة	-	-
Glioblastoma سرطان الدماغ	المصابة	56%	44%
	غير المصابة	-	-



صورة 46 لخلايا خط سرطان الحنجرة Hep-2 وتوضح التصاق الخلايا اللمفاوية الموجبة للمستضد CD8 والتي تثبت ان هذه الخلايا هي الخلايا اللمفاوية التائية السامة (الاسهم البيضاء) قوة تكبير 400



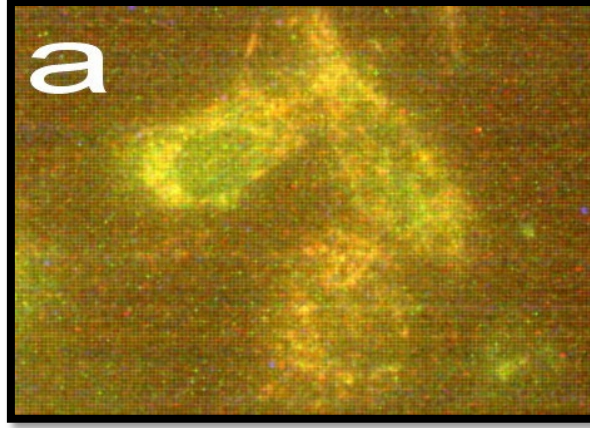
صورة 47 لخلايا خط سرطان العظله RD وتوضح التصاق الخلايا اللمفاوية الموجبة للمستضد CD8 والتي تثبت ان هذه الخلايا هي الخلايا اللمفاوية التائية السامة (الاسهم البيضاء) قوة تكبير 400



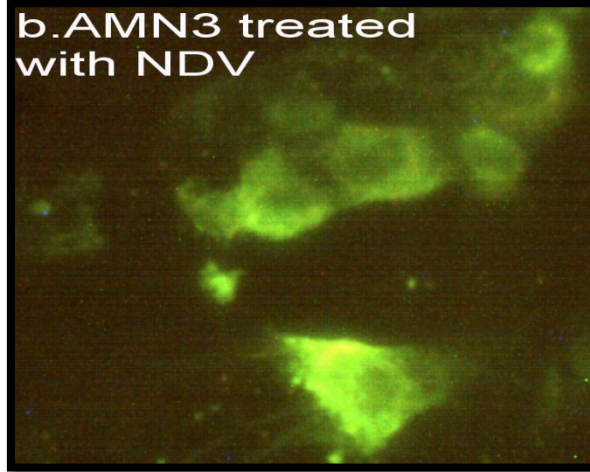
صورة 48 لخلايا خط سرطان الحنجرة Hep-2 وتوضح عدم التصاق الخلايا اللمفاوية على الخلايا السرطانية كونها غير مصابة بفايروس النيوكاسل

قابلية فايروس النيوكاسل العنقودية العراقية على استحداث الموت المبرمج في الاورام السرطانية المزروعة في المختبر

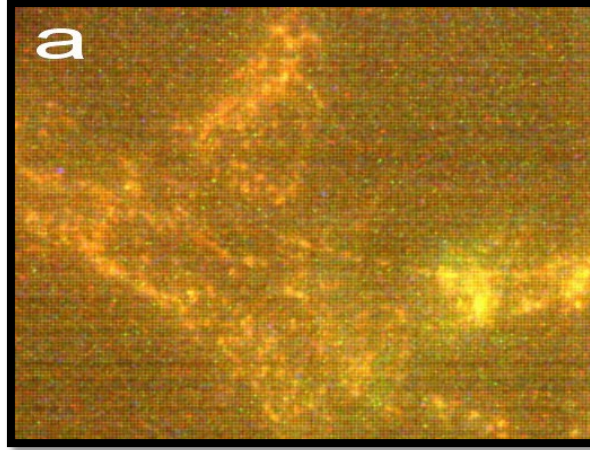
اظهرت النتائج باستعمال طريقة زيادة نفاذية بيوت الطاقة (الميتوكوندريا) كمؤشر على بدأ عملية الموت المبرمج ان لفايروس النيوكاسل القدرة على استحداث الموت المبرمج في كافة الخلايا السرطانية المختبرة حيث ان الصبغة المجهزة مع العدة والتي من المفترض ان تدخل الى داخل الخلية وتشع باللون الاخضر عند بقائها في هيولي الخلية ثم تدخل الى داخل بيوت الطاقة للتفاعل مع انزيماتها وتشع باللون الاحمر وهذا دلالة على ان الخلايا سليمة ولا تعاني موت مبرمج والخلايا التي تشع لون اخضر تعني ان بيوت الطاقة تعاني موت مبرمج وقد حدث اختلال في نفاذيتها لم يسمح بدخول تلك المادة وبالتالي لا يوجد بالخلية الا اللون الاخضر وهذا يعتبر دلالة على انها تعاني موت مبرمج وكما في الصور 49,50,51,52,53,54,55,56



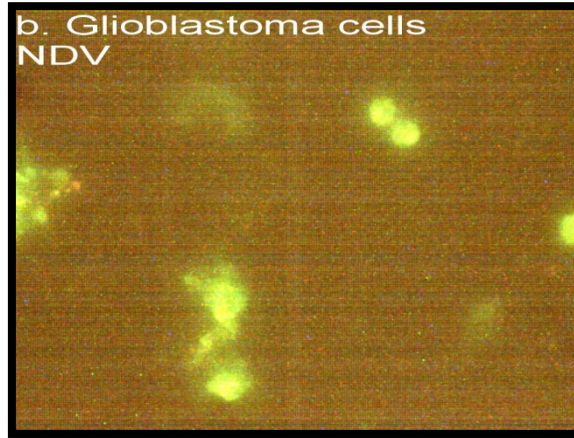
الصورة 49 وتوضح خلايا سرطانة الغدة اللبنية AMN3 غير المعاملة بفايروس النيوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاحمر دلالة على عدم حدوث عملية الموت المبرمج



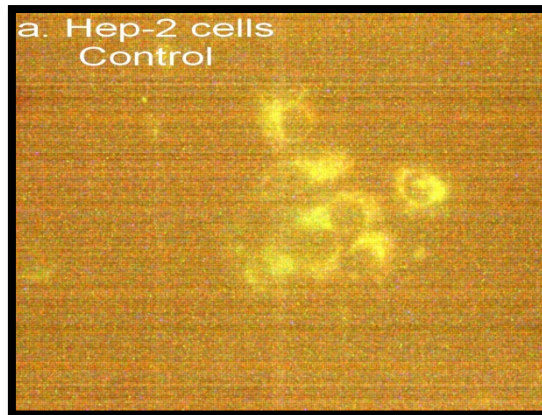
الصورة 50 وتوضح خلايا سرطانة الغدة اللبنية AMN3 المعاملة بفايروس النيوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاخضر دلالة على حدوث عملية الموت المبرمج



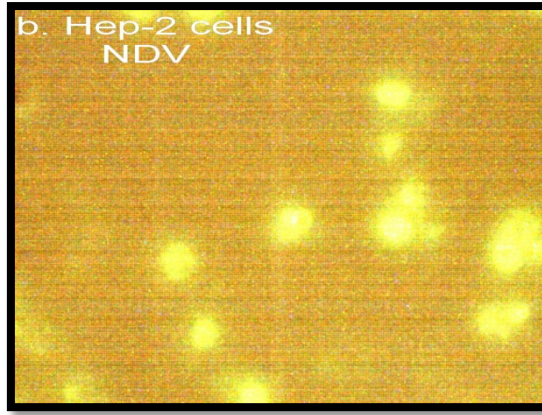
الصورة 51 وتوضح خلايا سرطان الدماغ glioblastoma غير المعاملة بفايروس النوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاحمر دلالة على عدم حدوث عملية الموت المبرمج



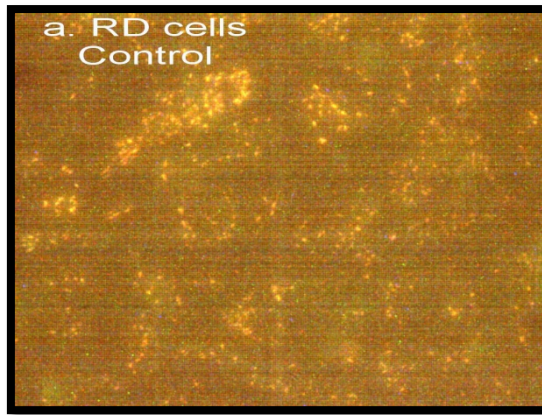
الصورة 52 وتوضح خلايا سرطانةالدماغ Glioblastoma المعاملة بفايروس النوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاخضر دلالة على حدوث عملية الموت المبرمج



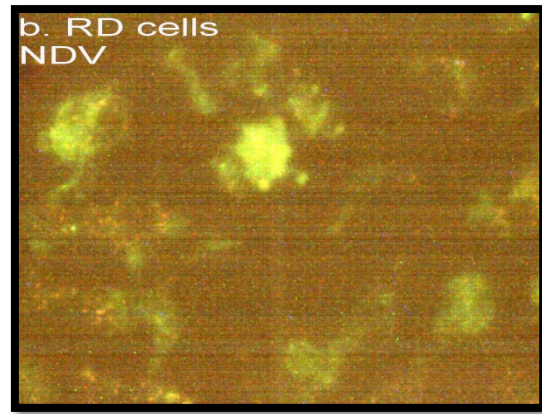
الصورة 53 وتوضح خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 غير المعاملة بفايروس النوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاحمر دلالة على عدم حدوث عملية الموت المبرمج



الصورة 54 وتوضح خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 المعاملة بفايروس النوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاخضر دلالة على حدوث عملية الموت المبرمج



الصورة 55 وتوضح خلايا سرطان العضلة RD غير المعاملة بفايروس النوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاحمر دلالة على عدم حدوث عملية الموت المبرمج



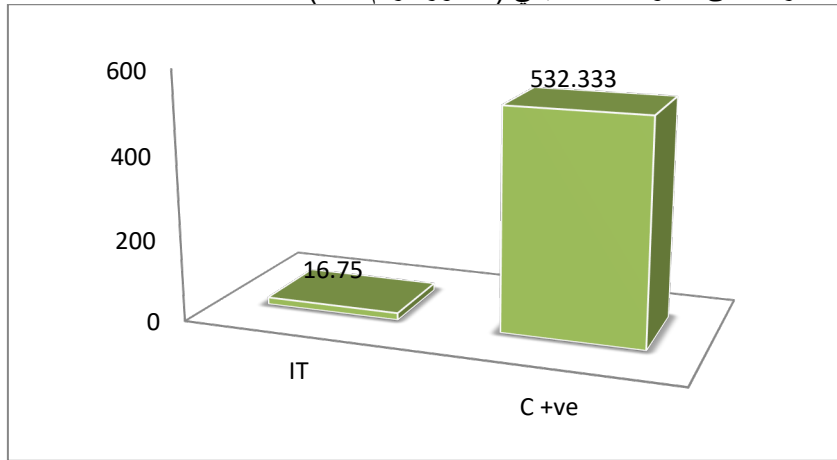
الصورة 56 وتوضح خلايا سرطان العضلة RD المعاملة بفايروس النوكاسل حيث نرى انها تشع باللون الاخضر دلالة على حدوث عملية الموت المبرمج

4. التجارب العلاجية Therapeutic Experiments

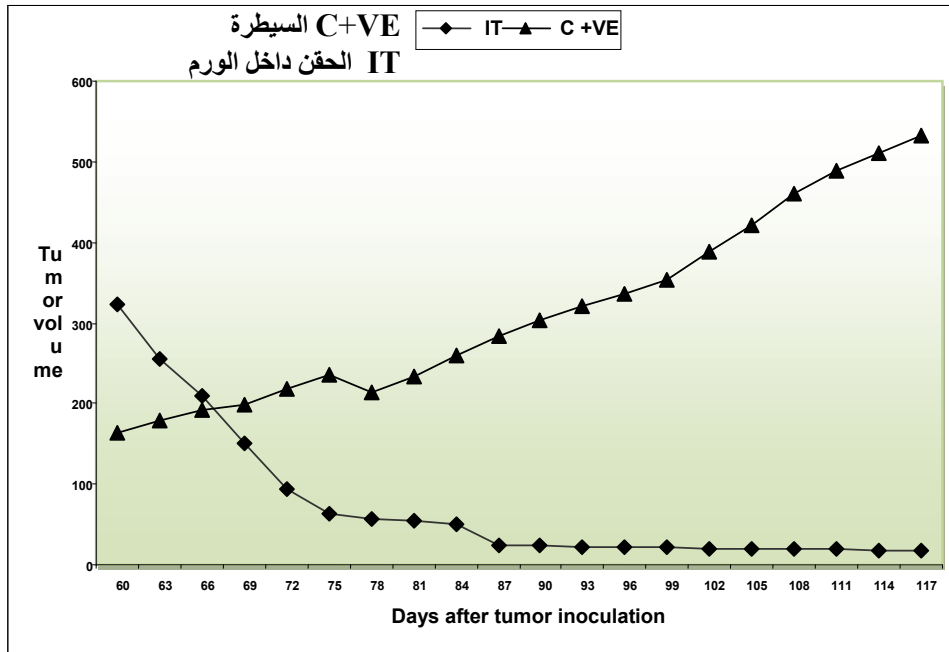
1.4. التجارب العلاجية على النماذج السرطانية البشرية

Therapeutic Experiment on Human Tumor Models

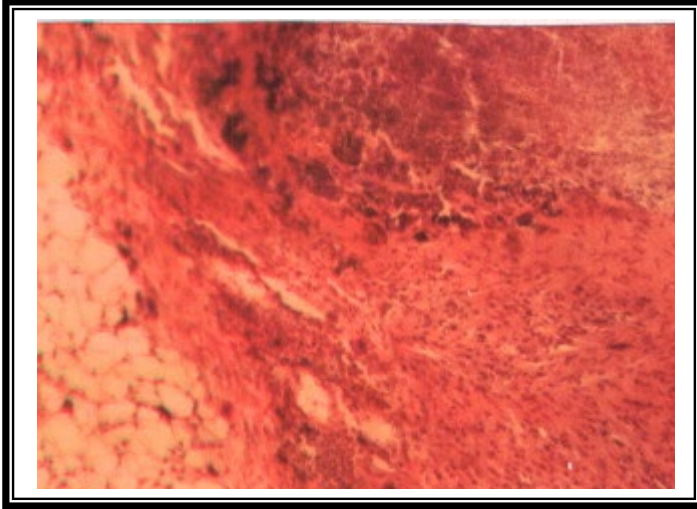
تضمنت هذه التجربة استخدام فنران مخفضة مناعياً تحمل السرطان البشري المعدي Gastric cancer (fibrosarcoma) والمعالجة بالحقن المتعدد داخل الورم بجرعة (256 HAU) لوحظ ضموراً كاملاً في ثلاثة فنران من أصل خمس فنران (60%) وذلك بعد (12-15-27) يوماً من بدء العلاج ، كما أظهر العلاج الفايروسي تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 90% وبمستوى مهم إحصائياً وعال المعنوية ($P < 0.001$) حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة غير المعالجة (الشكل رقم 1) . فقد أظهر حجم الورم انخفاضاً ملحوظاً بمستوى مهم إحصائياً ($P < 0.044$) منذ اليوم 27 من بدء العلاج (87 يوماً من الغرس) الذي أصبح عالي المعنوية في اليوم 45 من بدء العلاج (105 أيام من الغرس) الذي استمر حتى نهاية التجربة بمستوى مهم إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.001$) في اليوم 57 من بدء العلاج (117 يوماً من الغرس) (الشكل رقم 2) . أوضح الفحص النسيجي للورم السرطاني بعد 12 يوماً من العلاج ، وجود مناطق تنخر واسعة في النسيج الورمي فضلاً عن وجود خلايا سرطانية طبيعية (صورة رقم 57) . كما بين الفحص النسيجي في نهاية التجربة استبدال النسيج الورمي بتنخر وتكلس واسع (الصورة رقم 58) مقارنة مع أورام مجموعة السيطرة التي استمرت على النمو بشكل طبيعي (الصورة رقم 59) .



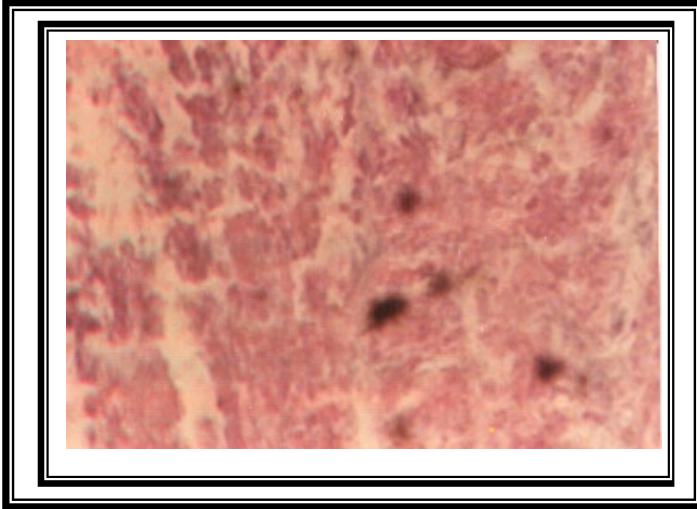
شكل رقم (1) يوضح الاثر التثبيطي للعلاج ببيفايروس النيوكاسل على نمو الورم عند نهاية التجربة للفنران التي تحمل السرطان المعدي البشري



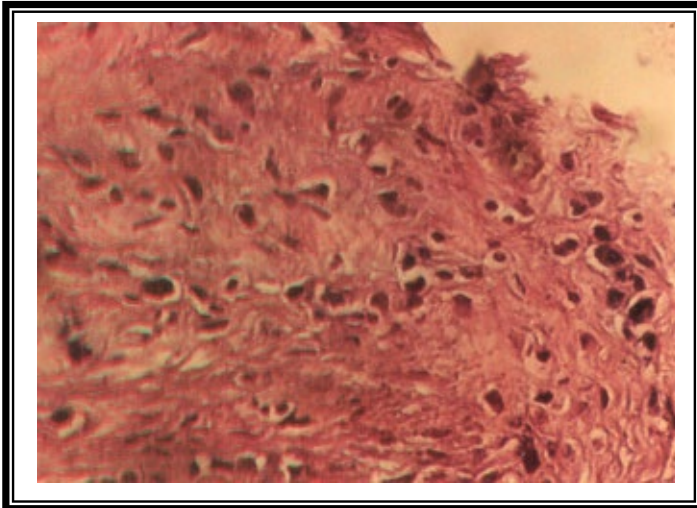
شكل رقم (2) يظهر تاثير العلاج بفايروس النيوكاسل على حجم الورم طيلة مدة المعالجة للفنران التي تحمل السرطان المعدي البشري



الصورة رقم (57) مقطع نسيجي
في سرطان المعدة البشري
(Fibrosarcoma)
والمعالج بثلاث حقنات داخل
الورم (12 يوم بعد بدأ العلاج)
ويلاحظ وجود مناطق تنخر
واسعة فضلا عن وجود نمو
لخلايا سرطانية (H&E)
(100 X).



الصورة رقم (58) مقطع نسيجي
في سرطان المعدة البشري
(Fibrosarcoma)
ويلاحظ أستبدال النسيج الورمي
بتنخر (H&E) (400 X).



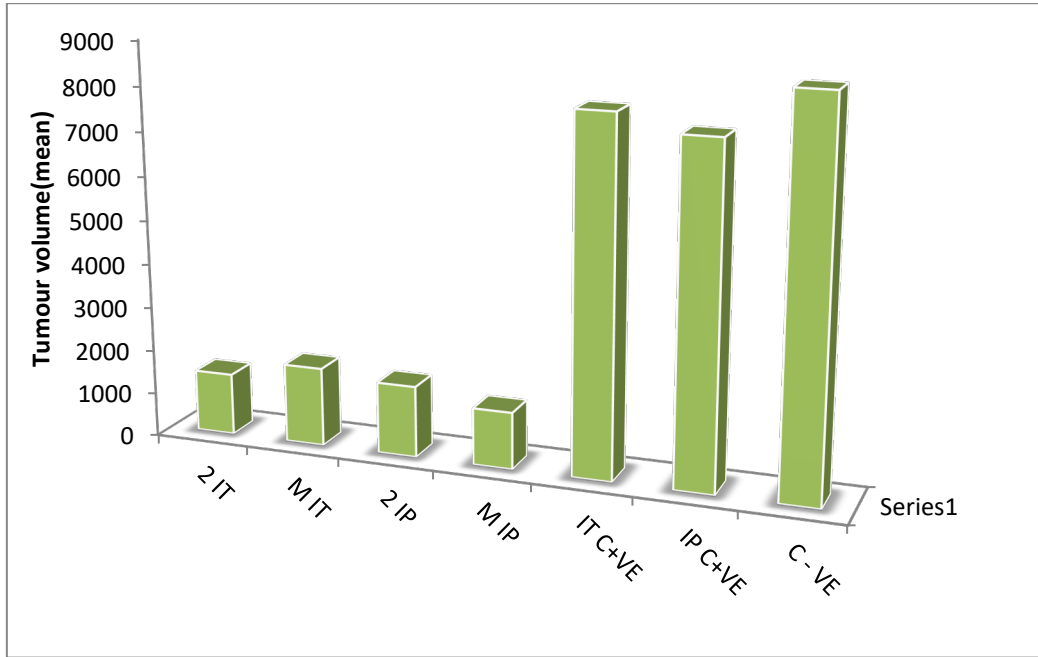
الصورة رقم (59) مقطع نسيجي
في سرطان المعدة البشري
لمجموعة السيطرة عند نهاية
التجربة (57 يوم) يظهر نمو
نمو النسيج الورمي بشكل جيد
(H&E) (200 X).

2. التجارب العلاجية على النماذج السرطانية الفئرية

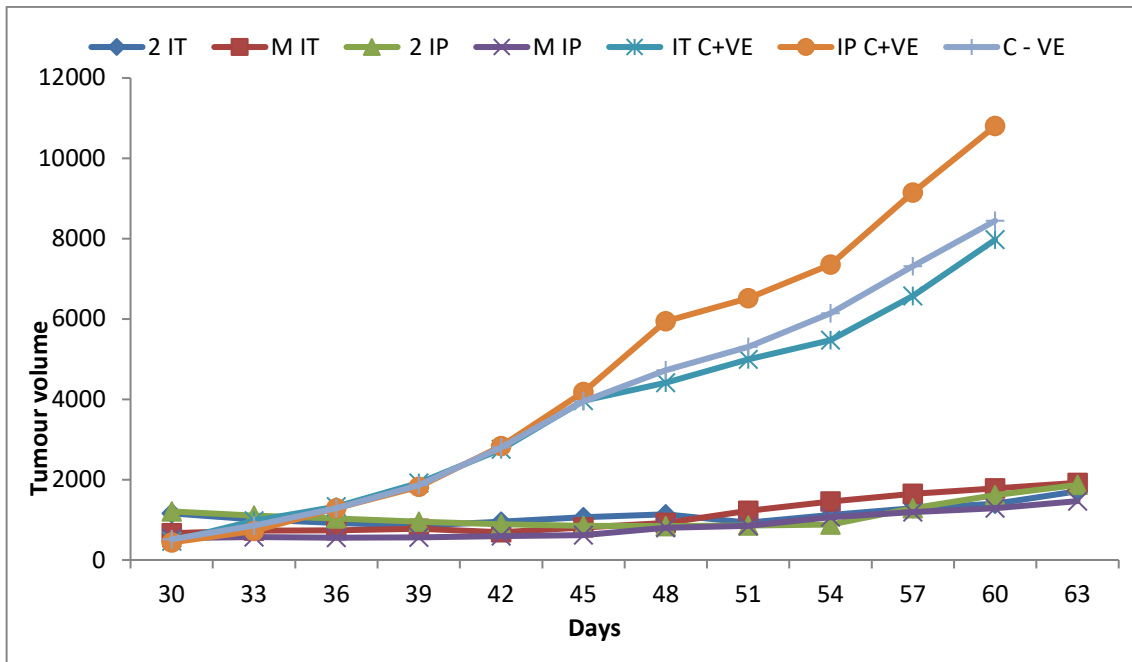
1. التجربة العلاجية الأولى

تضمنت هذه التجربة أربع مجاميع علاجية وثلاث مجاميع سيطرة ، المجموعة الأولى المعالجة بحقنيتين داخل الورم من فايروس النيوكاسل بفارق 18 يوم بينهما. أظهرت فئران هذه المجموعة ضموراً كاملاً في فأرة واحدة من أصل 5 فئران حاملة للورم (20%) وذلك بعد 15 يوماً من الحقن (45 يوماً من الغرس) . كما أظهر العلاج الفايروسي تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 82% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان وبشكل مهم إحصائياً وبفارق عالي المعنوية ($P < 0.0001$) وبنسبة 83% تثبيطاً لنمو الورم حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان وبشكل مهم إحصائياً وبفارق عالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 3) (الصورة رقم 60). أظهر حجم الورم انخفاضاً ملحوظاً بفارق مهم إحصائياً عالي المعنوية حين المقارنة مع السيطرة الموجبة منذ اليوم التاسع من الحقنة الأولى (39 يوماً من الغرس) ($P < 0.001$) استمر حتى نهاية التجربة في اليوم 60 من الغرس (بعد 30 يوماً من الحقنة الأولى) ($P < 0.0001$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي أظهرت فرقا مهما إحصائياً عالي المعنوية منذ اليوم التاسع من الحقنة الأولى ($P < 0.002$) واستمر حتى نهاية التجربة عند اليوم 60 من الغرس ($P < 0.0001$) الشكل رقم (4) . كما أن هناك إطلالة واضحة في عمر البقاء على قيد الحياة Prolong survival للفئران الحاملة الورم والخاضعة للعلاج بالحقن داخل الورم ولحقنيتين فقط كانت نسبة البقاء على قيد الحياة لهذه المجموعة بحلول اليوم 100 من غرس الورم 40% وبفارق مهم إحصائياً عالي المعنوية حين المقارنة بالسيطرة الموجبة ($P < 0.004$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة فكان فرق مهم إحصائياً عالي المعنوية ($P < 0.006$) فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة للسيطرة الموجبة والسالبة في اليوم 69 من غرس الورم 0% في حين أن نسبة البقاء للفئران المعالجة في ذلك اليوم هو 100% (الشكل رقم 5) . بين الفحص النسيجي للورم السرطاني بعد 6 أيام من الجرعة الأولى وجود مناطق واسعة من التخر وارتشاح خلايا التهابية وحيدة النواة mononuclear cell (البلعمات الكبيرة macrophage) مع ارتشاح للخلايا العدلة (الصورة رقم 61) . أما الأورام المفحوصة في نهاية التجربة فقد استبدل النسيج الورمي بنسيج جيبى granulation tissue حيث لوحظت مناطق تتخر واسعة مع نزف واحتقان في الأوعية الدموية مع وجود مناطق من خلايا نسيج ورمي سليم (الصورة رقم 62) . أما المجموعة الثانية التي عولجت بحقنات متعددة multiple injections من فايروس النيوكاسل فقد أظهرت فئران من أصل 5 فئران (40%) ضموراً كلياً Complete regression وذلك بعد 48-57 يوماً من غرس الورم على التوالي . كما أظهر العلاج الفايروسي المتعدد الحقنات تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 77% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان وبمستوى مهم إحصائياً وبفارق عالي المعنوية ($P < 0.0001$) وبنسبة 79% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي استمر نمو الورم فيها حتى موت الحيوان وبفارق عالي المعنوية مهم إحصائياً ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 3) . كما أظهر حجم الورم انخفاضاً ملحوظاً وبفارق مهم إحصائياً ($P < 0.037$) حين المقارنة مع السيطرة الموجبة منذ اليوم السادس على بدء الحقن (36 على الغرس) الذي أصبح عالي المعنوية في اليوم التاسع من بدء الحقن ($P < 0.0001$) واستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 60 من الغرس ($P < 0.0001$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ظهر

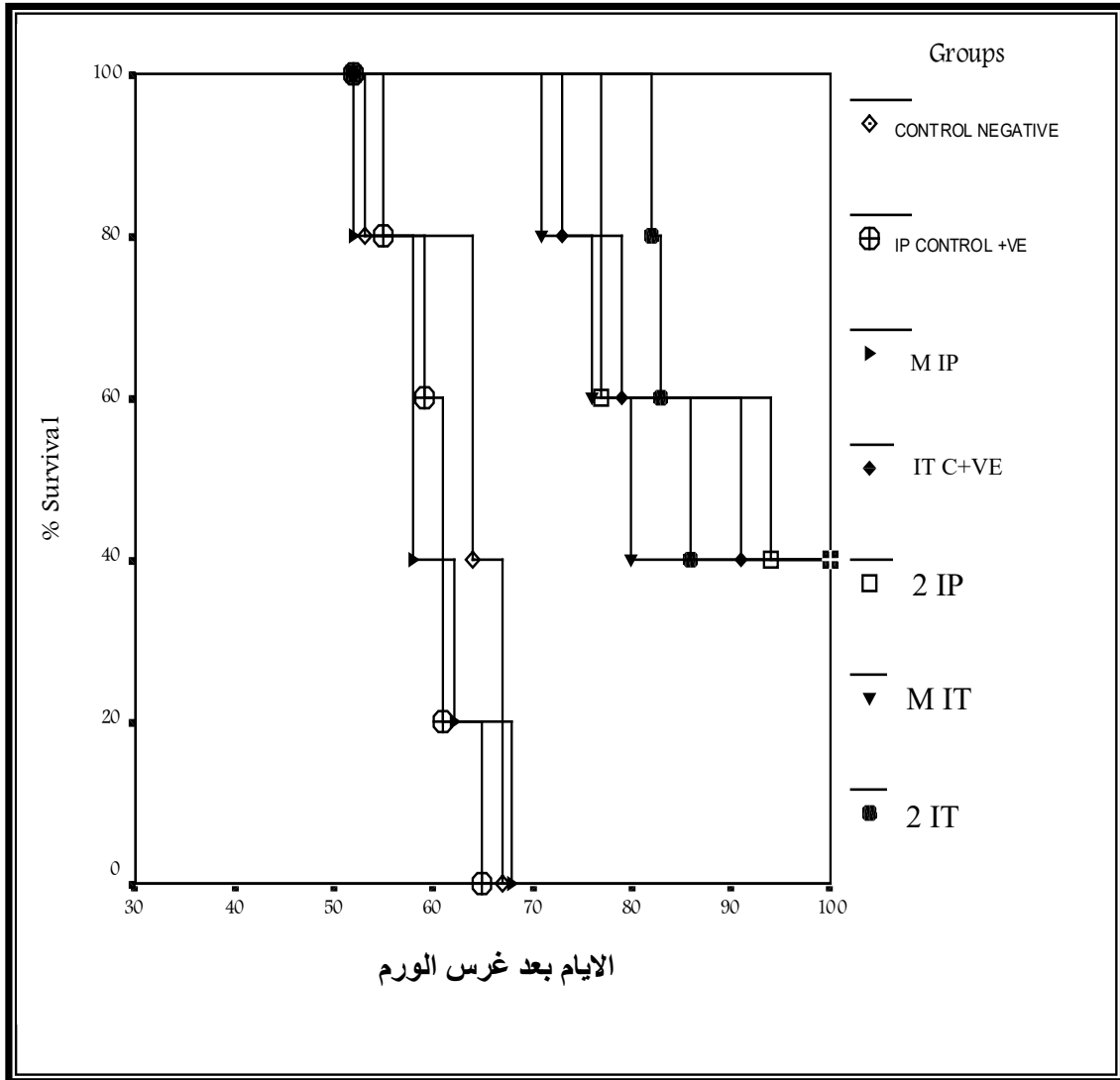
فرق مهم إحصائياً في اليوم 6 من بدء الحقن ($P < 0.048$) الذي أصبح عالي المعنوية في اليوم التاسع من بدء الحقن ($P < 0.001$) واستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 60 من الغرس ($P < 0.0001$) ، (الشكل رقم 4) .



الشكل رقم (3) يوضح الأثر التثبيطي للعلاج بفايروس النيوكاسل على نمو الورم عند نهاية التجربة للفئران التي تحمل سرطانة الغدة اللبئية الفئرية للتجربة الأولى



الشكل رقم (4) يظهر تأثير العلاج بفايروس على حجم الورم طيلة مدة المعالجة لفئران التجربة الأولى



الشكل رقم (5) منحني كابلان – ماير Kaplan-Meier يبين اثر العلاج بفايروس النيوكاسل على اطالة عمر البقاء على قيد الحياة لفئران التجربة الاولى

2 IT العلاج بحقتان داخل الورم	M IP العلاج بحقتان متعددة داخل الخلب	C – VE السيطرة السالبة (غير المحقونة)
M IT العلاج بحقتان متعددة داخل الورم	2 IP العلاج بحقتان داخل الخلب	
IT C+VE السيطرة للحقن داخل الورم	IP C+VE السيطرة للحقن داخل الخلب	

كما أن هنالك إطالة واضحة في عمر البقاء على قيد الحياة لفئران الحاملة للورم والخاضعة للعلاج بالحقن المتعدد داخل الورم حيث كانت نسبة البقاء على قيد الحياة لهذه المجموعة بحلول اليوم 100 من غرس الورم كانت 40% وهي ذات فرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية حين مقارنتها بالسيطرة الموجبة ($P < 0.001$) وبفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية حين مقارنتها بالسيطرة السالبة ($P < 0.002$) ، حيث كانت نسبة البقاء على قيد الحياة للسيطرة الموجبة والسالبة منذ اليوم 69 من غرس الورم 0% على حين أن الحيوانات المعالجة كانت نسبة بقائها على قيد الحياة في ذلك اليوم هي 100% (الشكل رقم 5) . أوضحت الصورة النسيجية للأورام المعالجة بحقتين (6 أيام من بدء العلاج) تشابه للمجموعة الاولى مع مناطق نخر واسع وارتشاح خلايا التهابية وحيدة النواة وعدلات مع وجود نزف واحتقان في الأوعية الدموية (الصورة رقم 63) ويلاحظ تعجي هولي بعض

الخلايا السرطانية vaculation (الشبيه بالموت المبرمج apoptosis like) (الصورة رقم 64) الأورام المفحوصة في نهاية التجربة أظهرت صورة مشابهة مع نخر أوسع.

أما المجموعة الثالثة المعالجة بالحقن داخل الخلب بحقتين بينهما 18 يوماً ، فأظهرت فأرة واحدة من أصل 5 فئران 20% ضموراً كلياً وذلك بعد 27 يوماً من الحقن . كما أظهر العلاج الفايروسي تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 78% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوانات وبشكل مهم إحصائياً وبفرق عالي المعنوية ($P < 0.0001$) وبنسبة 81% تثبيط لنمو الورم حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة وبفرق مهم إحصائي عالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 3) . كما أظهر حجم الورم انخفاضاً ملحوظاً وبفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية حين المقارنة مع السيطرة الموجبة ومنذ اليوم التاسع على الحقنة الأولى (39 من بدء الغرس) ($P < 0.005$) وازدادت نسبة المعنوية بعد الحقنة الثانية (بعد ثلاثة أيام منها) 21 يوماً من بدء الحقن ($P < 0.0001$) واستمر حتى نهاية التجربة عند اليوم 60 من الغرس (30 يوماً من بدء الحقن) الذي أظهر فرقاً مهماً إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ومن اليوم التاسع من الحقنة الأولى ($P < 0.004$) ، وازدادت نسبة المعنوية بعد ثلاثة أيام من الحقنة الثانية ($P < 0.0001$) (21 يوماً من بدء الحقن) واستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 60 من غرس الورم الذي أظهر فرقاً مهماً إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 4) .

كما أن هنالك إطالة واضحة في عمر البقاء على قيد الحياة للفئران الحاملة للورم والخاضعة للعلاج فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة لهذه المجموعة بحلول اليوم 100 من غرس الورم 40% وهي بفرق مهم إحصائياً عالي المعنوية حين المقارنة مع السيطرة الموجبة ($P < 0.002$) ، وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي كانت بفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.002$) ، حيث كانت نسبة البقاء على قيد الحياة للسيطرة الموجبة والسالبة بحلول اليوم 66 هي 0% على حين كانت فئران مجموعة المعالجة في ذلك اليوم هي 100% ، (الشكل رقم 5) . بينت الصورة النسيجية للأورام المعالجة بحقنة واحدة بعد 6 أيام وجود تنخر واسع مع ارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة النواة والخلايا العدلة (الصورة رقم 65) ، أما الأورام المفحوصة في نهاية التجربة فقد أظهرت صورة مماثلة من النخر والارتشاح الواسع للخلايا الالتهابية.

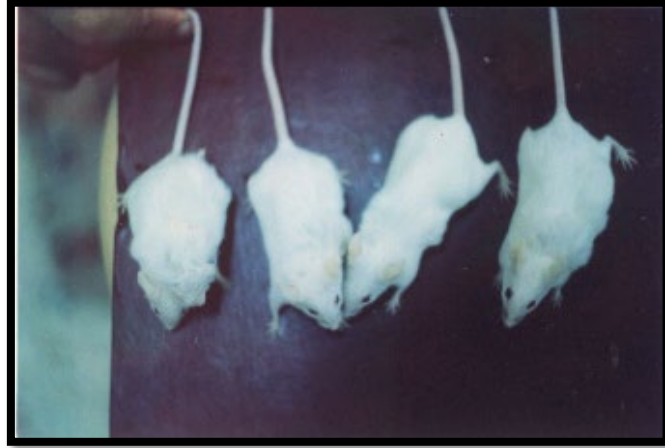
أما المجموعة الرابعة المعالجة بالحقن داخل الخلب ولحقنات متعددة فقد أظهرت فئران من أصل 5 فئران 40% ضموراً كلياً وذلك بعد 9-18 يوماً من بدء العلاج ، كما أظهر العلاج الفايروسي تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 83% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة و 85% حين المقارنة مع السيطرة السالبة وبفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية للمجموعتين ($P < 0.001$) ، (الشكل رقم 3) .

كما أظهر حجم الورم انخفاضاً ملحوظاً وبفرق مهم إحصائياً ($P < 0.011$) حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة منذ اليوم السادس على بدء العلاج أي بعد حقتين (36 يوماً من الغرس) الذي أصبح فرقاً عالي المعنوي في اليوم 9 من بدء العلاج ($P < 0.0001$) واستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 60 ($P < 0.0001$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة منذ اليوم السادس على بدء العلاج أظهر فرقاً مهماً إحصائياً ($P < 0.011$) ليصبح عالي المعنوية في اليوم 9 من الحقن ($P < 0.0001$) ليستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 60 من الغرس (30 من بدء العلاج) ($P < 0.001$) ، (الشكل رقم 4) .

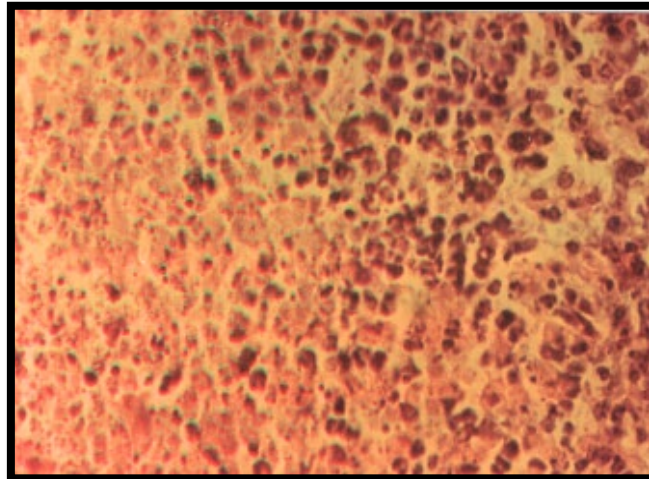
كما أن هنالك إطالة واضحة في عمر البقاء على قيد الحياة للفئران الحاملة للورم والخاضعة للعلاج بالحقن المتعدد داخل الخلب فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة لهذه المجموعة في اليوم 100 من غرس الورم

40% وهي بفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية حين المقارنة مع السيطرة الموجبة ($P < 0.002$) وبفرق مهم إحصائياً عالي المعنوية عند المقارنة مع السيطرة السالبة ($P < 0.002$) فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة للسيطرة الموجبة والسالبة 0% في اليوم رقم 66 على حين كانت فئران مجموعة المعالجة على قيد الحياة وبنسبة 100% (الشكل رقم 5) الصورة النسيجية للأورام المعالجة بحقنيتين (6 أيام من بدء العلاج) أوضحت مناطق النخر واسعة وارتشاح خلايا التهابية ، أما الفئران المفحوصة في نهاية التجربة فقد لوحظت صورة أوسع من النخر والارتشاح للخلايا الالتهابية وحييدة النواة والعدلات (الصورة رقم 66) .

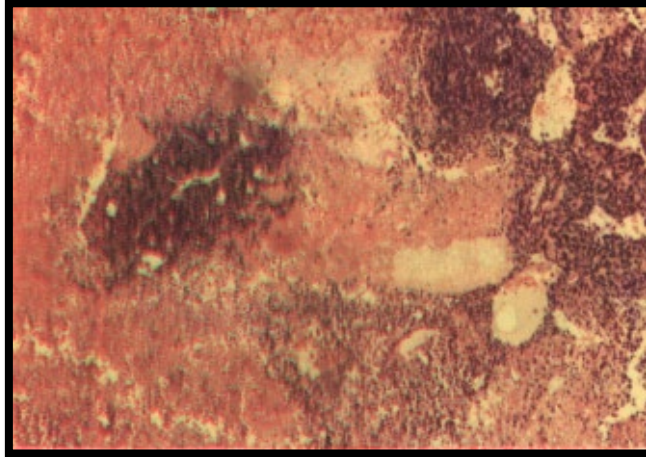
كما أظهرت النتائج وجود فرق مهم إحصائياً لصالح مجموعة المعالجة بالحقن المتعدد داخل الورم حين المقارنة مع مجموعة الحقنات داخل الورم ($p < 0.048$) في نهاية التجربة (اليوم 60) مع عدم وجود فروق مهمة إحصائياً بين باقي مجاميع المعالجة.



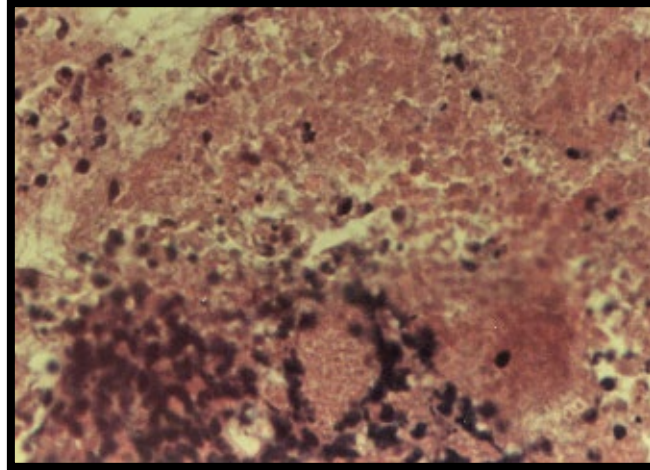
الصورة رقم (60) فئران من التجربة الأولى للمجموعة الأولى لسرطانة الغدة اللبنية الفئرية ,من اليمين فأرة من مجموعة السيطرة يقارن حجم الورم فيها مع حجم الأورام في مجموعة المعالجة التي تظهر تثبيطا واضحا لنمو الورم .



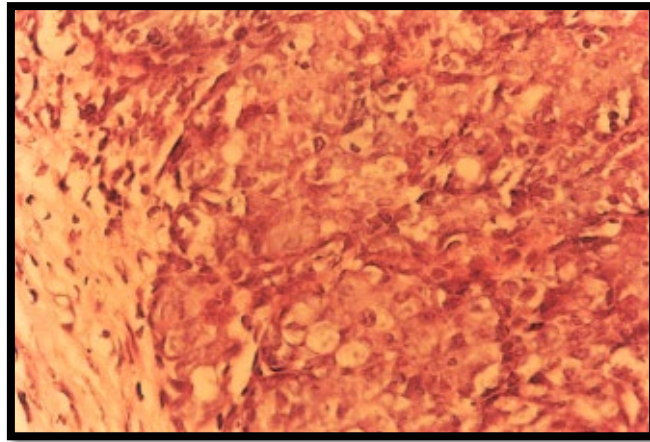
الصورة رقم (61) مقطع نسيجي في سرطانة الغدة اللبنية الفئرية لخط AN3 والمعالجة بالحقن داخل الورم (بعد 6 ايام من الحقنة الاولى) تشاهد مناطق تنخر وارتشاح خلايا التهابية وحييدة النواة (H&E) (100 X) . (



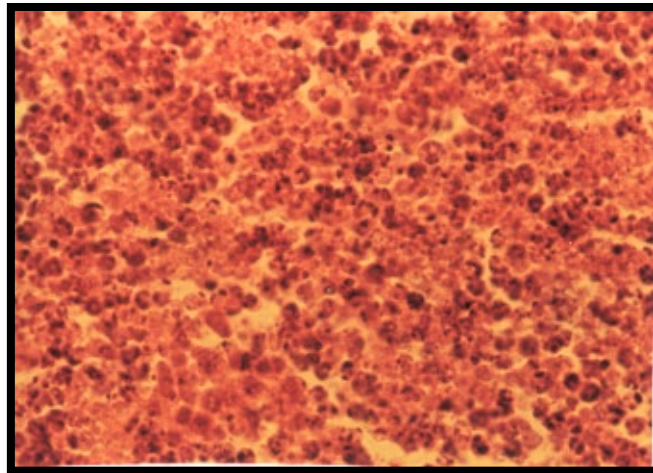
الصورة (62) مقطع نسيجي في سرطانة الغدة اللمبية الفترية لخط AN3 والمعالجة بحقنتان فقط (عند نهاية التجربة) تلاحظ مناطق نخر واسعة مع نزف واحتقان في الأوعية الدموية ووجود مناطق لنسيج ورمي سليم (H&E) (40 X)



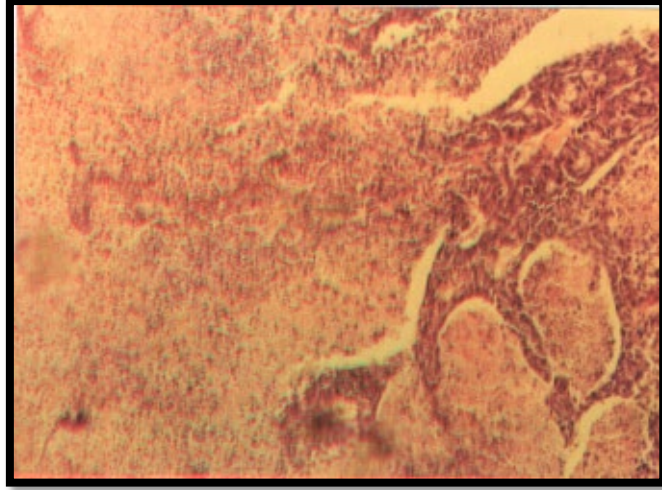
الصورة رقم (63) مقطع نسيجي في أحد أورام خط AN3 السرطاني للتجربة الأولى (المجموعة الثانية) والمعالجة بحقنتين داخل الورم (6 أيام من بدأ العلاج) ويشاهد فيها مناطق نخر واسع مع نزف واحتقان في الأوعية الدموية (H&E) (400 X) .



الصورة رقم (64) مقطع نسيجي في الورم المعالج بحقنات متعددة داخل الورم وتظهر تفجفي
Vacculation والشبيه بالموت المبرمج Apoptosis like (H&E) (200 X) .



الصورة رقم (65) مقطع نسيجي في ورم AN3 لحيوان معالج بالحقن داخل الخلب وذلك بعد 6 ايام من
الحقن ويشاهد تنخر واسع مع ارتشاح خلايا التهابية (H&E) (40 X) .



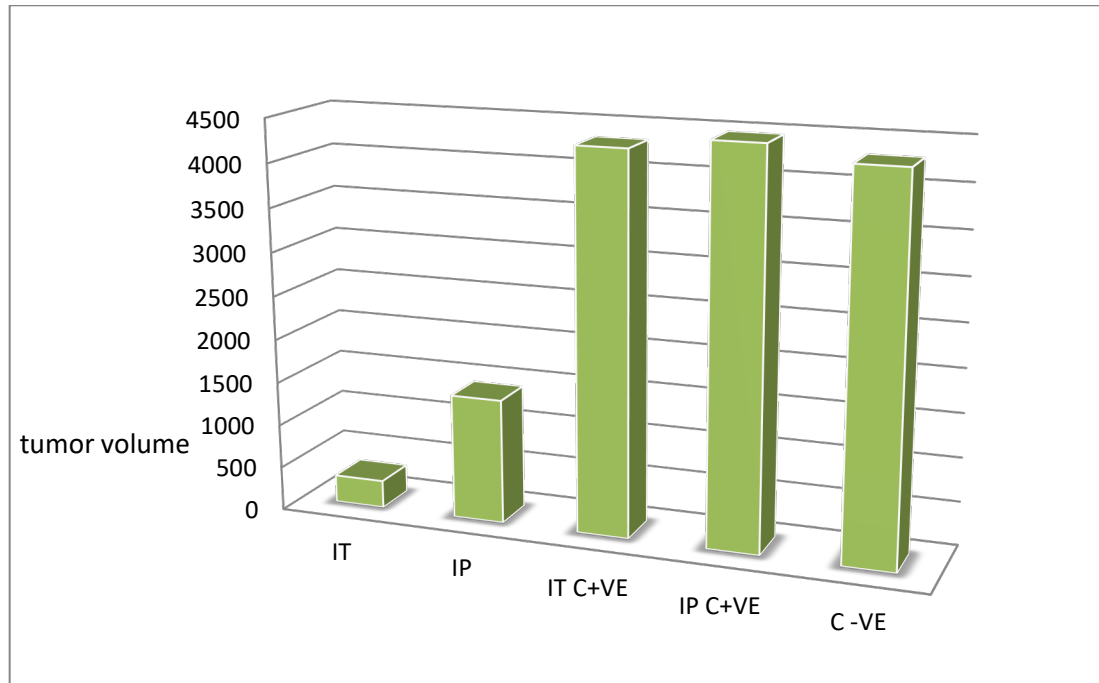
الصورة (65) مقطع نسيجي لورم AN3 لحيوان معالج بحقنات متعددة داخل الخلب عند نهاية التجربة ، يلاحظ فيها تنخر واسع مع ارتشاح لبعض الخلايا الالتهابية وحيدة النواة وعدلات (H&E) (100 X)

التجربة العلاجية الثانية

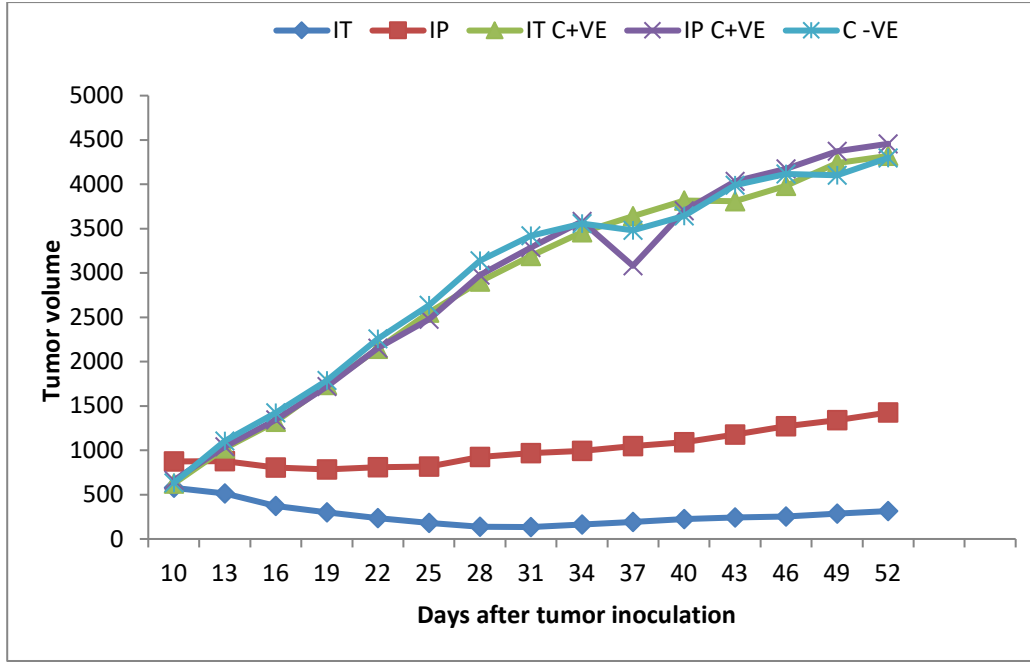
تضمنت هذه التجربة مجموعتين علاجيتين ، الأولى عن طريق الحقن داخل الورم والثانية بالحقن داخل الخلب . أظهرت فئران مجموعة العلاج بالحقن داخل الورم ضموراً كاملاً في 3 فئران من أصل 5 فئران (60%) وذلك بعد 15 ، 18 يوم من بدء العلاج وبمستوى مهم إحصائياً ($P < 0.04$) حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة والسالبة. كما أظهر العلاج الفايروسي تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 92% عند المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان وبشكل مهم إحصائياً وبفرق عالي المعنوية ($P < 0.0001$) وبنسبة 92.9% عند المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة وبفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 6) . كما أظهر حجم الورم انخفاضاً ملحوظاً وبفرق مهم إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.009$) حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة ومنذ اليوم الثالث على بدء العلاج و 13 يوماً من غرس الورم وحتى نهاية التجربة عند اليوم 52 من الغرس (42 من بدء العلاج) أظهرت فرقاً مهماً إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) . وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ومنذ اليوم الثالث على بدء العلاج (13 يوماً من غرس الورم) ($P < 0.003$) وحتى نهاية التجربة في اليوم 52 من الغرس (42 يوماً من بدء العلاج) و أظهرت فرقاً مهماً إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 7) . كما توجد إطالة واضحة في عمر البقاء على قيد الحياة للفئران الحاملة للورم والخاضعة للعلاج بالحقن داخل الورم فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة لهذه المجموعة في اليوم 100 من غرس الورم كانت بنسبة 60% وبفرق مهم إحصائياً ($P < 0.004$) حين مقارنتها مع مجموعة السيطرة الموجبة وبفرق مهم إحصائياً ($P < 0.003$) حين مقارنتها مع مجموعة السيطرة السالبة حيث كانت نسبة البقاء على قيد الحياة للسيطرة الموجبة والسالبة 0% منذ اليوم 61 على حين كانت فئران مجموعة المعالجة على قيد الحياة وبنسبة 100% (الشكل رقم 8).

كما أن حجم الورم في مجموعة المعالجة بالحقن المتعدد أقل بشكل مهم إحصائياً ($P < 0.002$) حين المقارنة مع مجموعة الحقن داخل الخلب. فضلاً عن أن مجموعة المعالجة بالحقن داخل الورم أظهرت إطالة واضحة في عمر البقاء على قيد الحياة وبشكل مهم إحصائياً ($P < 0.04$) حين المقارنة مع مجموعة العلاج بالحقن داخل الخلب . وقد أظهر الفحص النسيجي صورة مشابهة للفئران المعالجة في التجربة الثالثة .

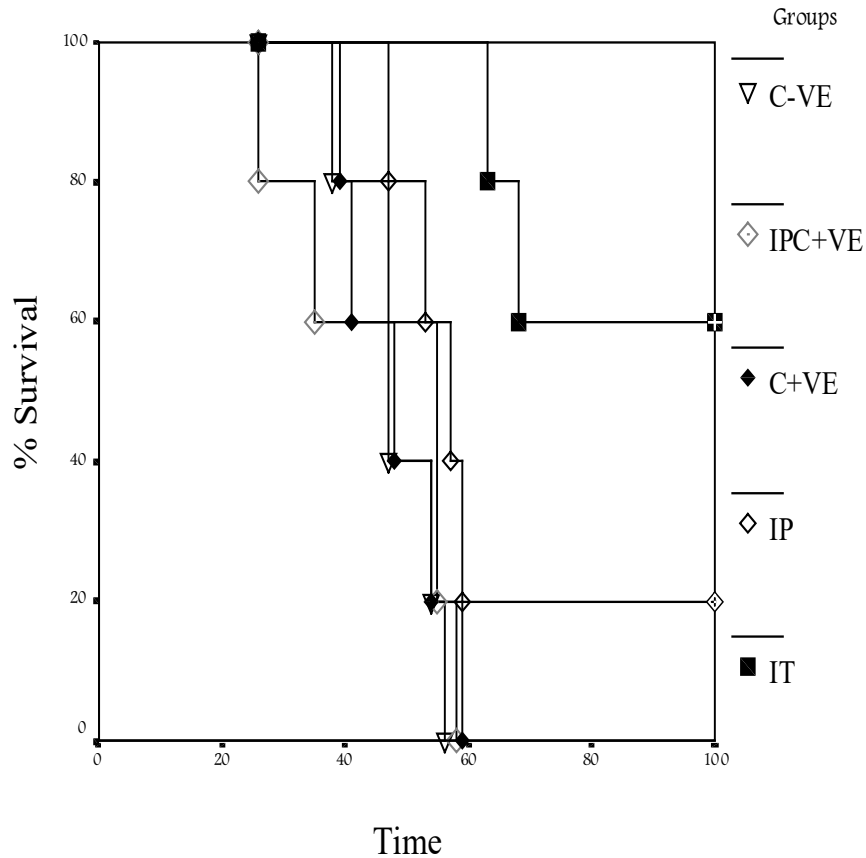
أما مجموعة المعالجة بالحقن داخل الخلب بحقنات متعددة multiple injections فقد أظهرت فآرة واحدة ضموراً كاملاً من أصل 5 فئران (20%) وذلك بعد 12 يوماً من العلاج، كما أظهر العلاج الفايروسي تثبيطاً لنمو الورم بنسبة 67% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي استمر نمو الورم فيها من دون توقف حتى موت الحيوان وبشكل مهم إحصائياً وبفرق عالي المعنوية ($P < 0.001$) وبنسبة 66% حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي استمر نمو الورم فيها وبشكل إحصائياً وبفرق عالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل 6). كما أظهر الورم انخفاضاً ملحوظاً وبفرق مهم إحصائياً حين المقارنة مع السيطرة الموجبة ومنذ اليوم السادس من بدء العلاج (16 من الغرس) ($P < 0.05$) والذي أصبح عالي المعنوية عند اليوم 9 من العلاج (19 من الغرس) ($P < 0.008$) واستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 52 من الغرس (42 يوماً من بدء العلاج) الذي أظهر فرقاً مهماً إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ومنذ اليوم السادس على بدء العلاج و 16 من الغرس التي أظهرت فرقاً مهماً إحصائياً ($P < 0.02$) وأصبح عالي المعنوية عند اليوم 9 من العلاج (19 يوم من الغرس) ($P < 0.005$) واستمر حتى نهاية التجربة في اليوم 52 من الغرس (42 من العلاج) وأظهر فرقاً مهماً إحصائياً وعالي المعنوية ($P < 0.0001$) (الشكل رقم 7) كما أن هنالك إطالة في عمر البقاء على قيد الحياة للفئران الحاملة للورم والخاضعة للعلاج بالحقن داخل الخلب فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة لهذه المجموعة بحلول اليوم 100 من غرس الورم 20% ولا يوجد فرق مهم إحصائياً حين المقارنة بينها وبين مجموعة السيطرة الموجبة ($P < 0.25$) وكذلك حين المقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ($p < 0.2$) فقد كانت نسبة البقاء على قيد الحياة للسيطرة الموجبة والسالبة 0% عند اليوم 61 في حين كانت نسبة البقاء للفئران المعالجة في ذلك اليوم هي 02% (الشكل رقم 8). أوضحت الصورة النسيجية وجود مناطق متنخرة مع بعض الارتشاح للخلايا الالتهابية ووجود نسيج ورمي سليم.



شكل رقم (6) يوضح الاثر التثبيطي للعلاج بفايروس النيوكاسل على نمو الورم عند نهاية التجربة لفئران التجربة الثانية التي تحمل سرطانة الغدة اللبنية الفئرية



شكل رقم (7) يظهر تاثير العلاج بالفايروس على حجم الورم طيلة فترة المعالجة لفئران التجربة الثانية

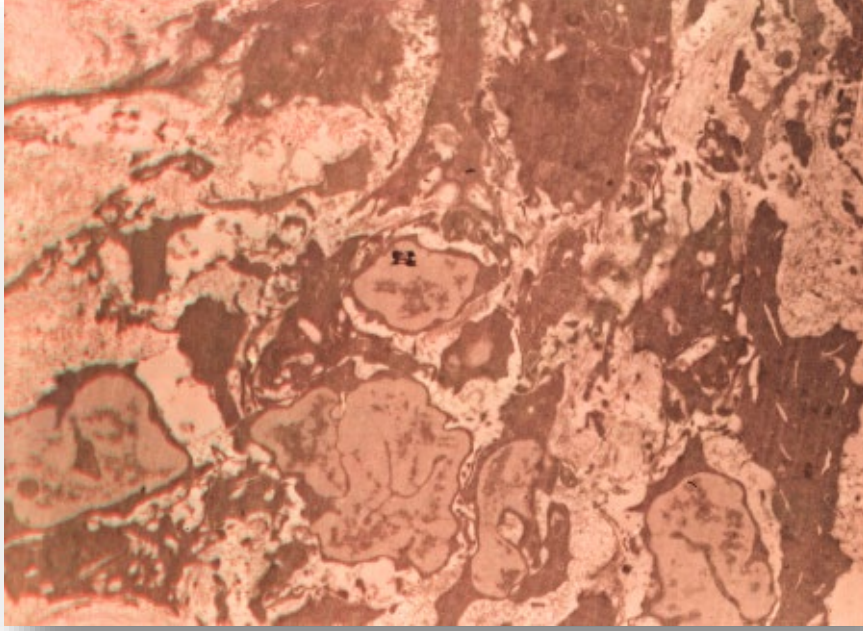


الشكل رقم (8) منحني كابلان - ماير Kaplan-Meier يبين اثر العلاج بفايروس النيوكاسل على اطالة عمر البقاء على قيد الحياة لفئران التجربة الثانية

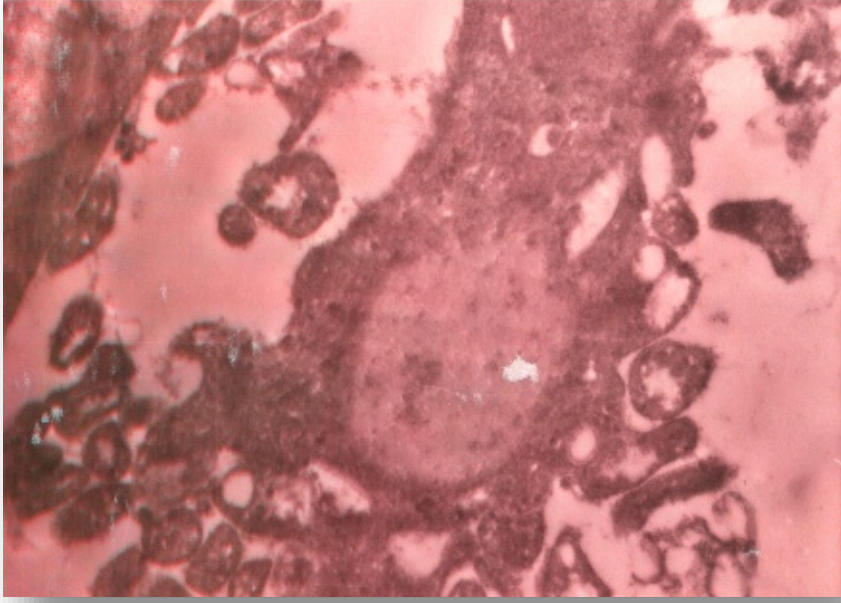
IT 2 العلاج بحقتان داخل الورم	MIT 2 العلاج بحقتان داخل الورم	IT C+VE 4 السيطرة للحقن داخل الورم	C-VE السيطرة السالبة (غير المحقونة)
IP MIP العلاج بحقتان داخل الخلب	IP 2 العلاج بحقتان داخل الخلب	IP C+VE السيطرة للحقن داخل الخلب	

الفحص فوق المجهرى للأورام المعالجة بفايروس النيوكاسل

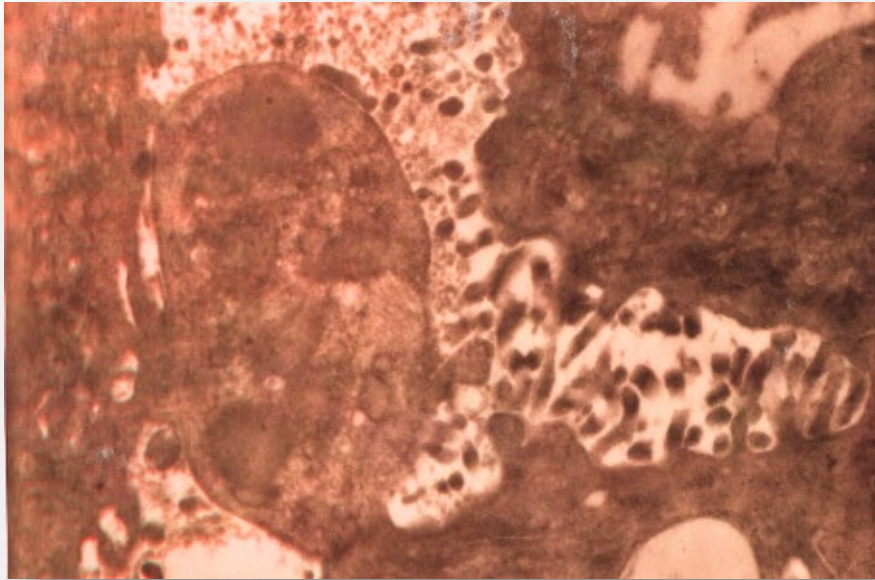
يوضح فحص ورم معالج بحقنة واحدة بعد 73 ساعة بالمجهر الإلكتروني النافذ التأثير المحطم والحال للخلايا السرطانية (Oncolysis (cytolytic effect) فقد لوحظ تحطم سايتوبلازم الخلايا السرطانية و وجود كثير من الخلايا السرطانية في أطوار مختلفة من النخر necrosis والناجمة بفعل الفايروس المتكاثر في سايتوبلازم الخلية السرطانية (الصورة رقم 67). كما أظهر الفحص فوق المجهرى وجود خلايا سرطانية تظهر عملية الموت المبرمج apoptosis التي تميزت بوجود أجسام الموت المبرمج apoptotic bodies التي هي إحدى العلامات الأخيرة لعملية الموت المبرمج (الصورة رقم 68). فقد يلاحظ تبرعم فايروس النيوكاسل من الخلايا السرطانية المصابة (الصورة رقم 69) . وقد أخذ الفايروس أشكال عدة من كروي إلى بيضوي أو خيطي وقد وصل قطر الفايروس الى 140-266 نانوميتر بمتوسط 193 نانوميتر وقد وصلت أطوال الأشكال الخيطية الى 426-693.3 نانوميتر بمتوسط 577.76 نانوميتر .



الصورة (67) الفحص فوق المجهرى للورم السابق نفسه وتظهر وجود الكثير من الخلايا لسرطانية في أطوار مختلفة من النخر Necrosis (خلات اليورانيل وسترات الرصاص- 5400 X).



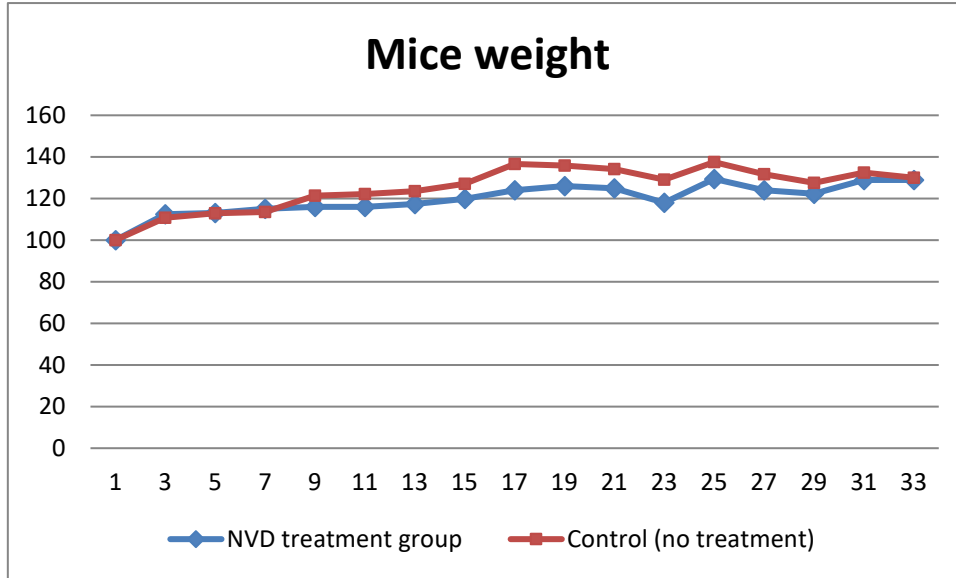
الصورة رقم (68) بالمجهر الإلكتروني النافذ للورم المعالج بفايروس النيوكاسل توضح خلية سرطانية تعاني من عملية الموت المبرمج Apoptosis حيث تشاهد أجسام الموت المبرمج المميزة Apoptotic Bodies (خلات اليورانيل وسترات الرصاص- 19000 X) .



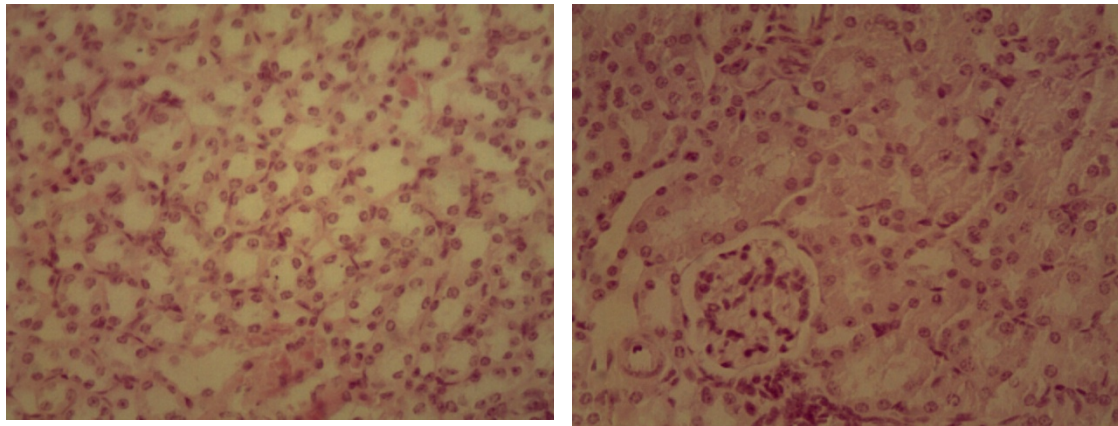
الصورة رقم (69) الفحص فوق المجهر للورم المعالج ويلاحظ تبرعم فايروس النيوكاسل من الخلايا السرطانية المصابة ، معدل قطر الفايروس 193 نانوميتر الكروي وشبه الكروي و 577.7 للاثكال الخيطية (خلات اليورانيل وسترات الرصاص- 25000 X) .

5. اختبار سمية فايروس النيوكاسل على الفئران الطبيعية

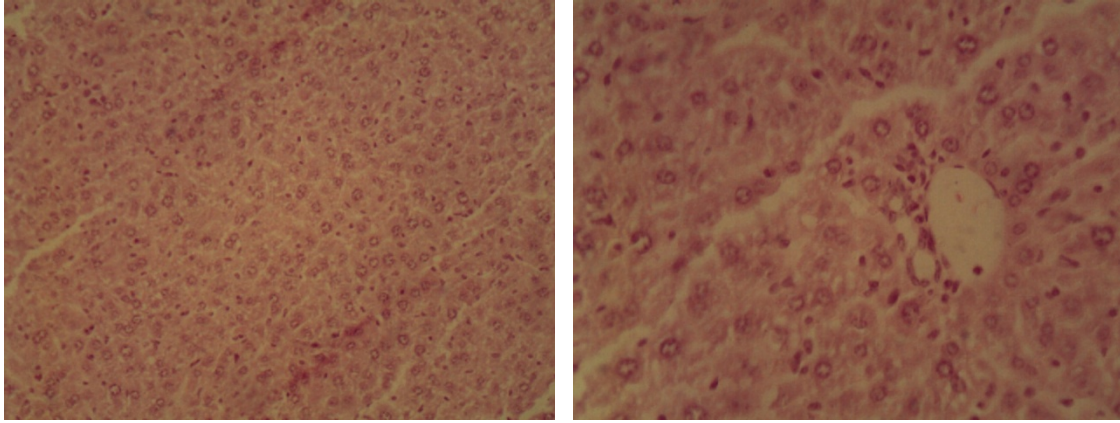
أوضحت تجربة اختبار سمية الفايروس على الفئران حديثة الولادة والفئران البالغة والمحقونة داخل القحف أو داخل الخلب عدم وجود أعراض غير طبيعية ولم تسجل أي تغيرات مرضية نسيجية في الأعضاء الداخلية لحيوانات التجربة عند استعمال (512 HAU) وكما في الصور 70, 71, 72, 73. وعند اجراء مقارنة بين وزن الحيوانات المعالجه وغير المعالجه لم يكن هناك فرق معنوي مما يشير الى عدم وجود تاثير سمي للفايروس على الفئران (شكل رقم 9).



الشكل رقم 9 يوضح عدم وجود فرق معنوي بين وزن الفئران المعالجه وغير المعالجه بفايروس النيوكاسل العنتره العراقية مما يوضح سلامتها وامان استعمالها كعلاج



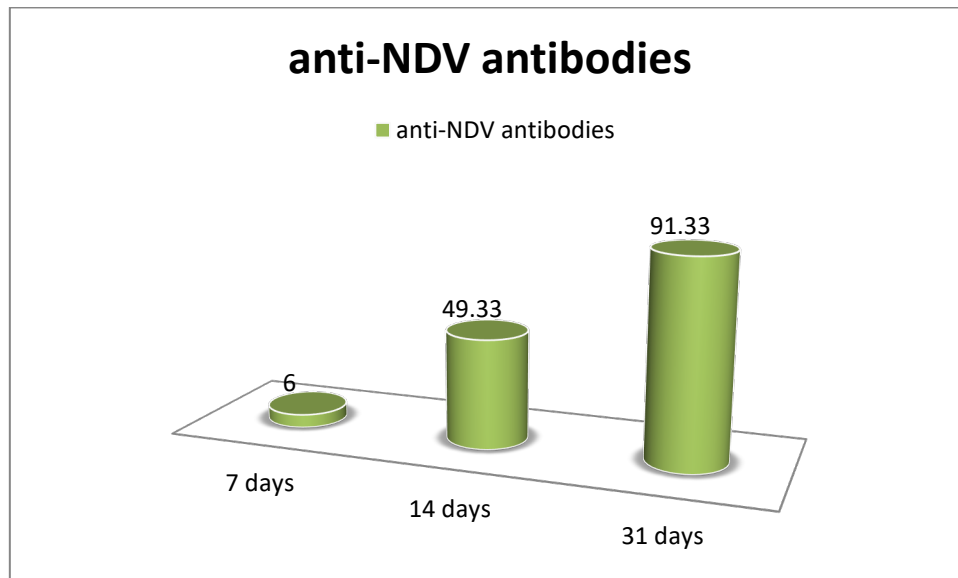
الصورة رقم 70 71 يوضحان مقطعاً في كلية الحيوانات المحقونه بالفايروس حيث نلاحظ عدم وجود تغيرات في محفظة بومان او في النبيبات الكلوية (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين) تكبير 400



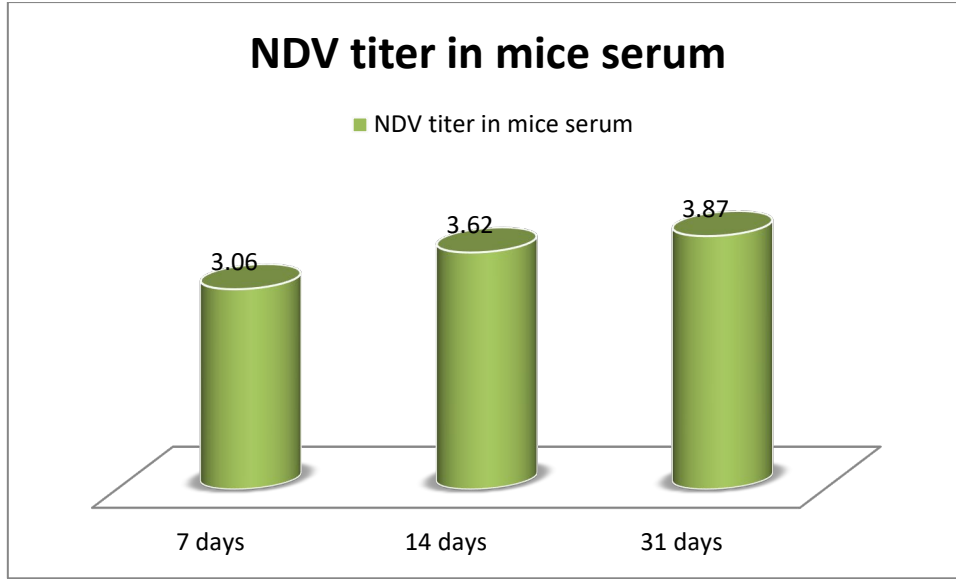
الصورة رقم 72 و 73 لمقطعين في الكبد ونلاحظ عدم وجود تغيرا تذكر في النسيج الكبدي للحيوانات المعالجه (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين) تكبير 400

دراسة وجود الفايروس في دم الفئران المعالجه واضدادها

تم سحب دم من الفئران المعالجه بعد التضحية بها وخلال ثلاث فترات (اسبوع, اسبوعان وثلاث اسابيع) بعد حقن الفايروس في الورم ونلاحظ من الشكل رقم 10 تطور الاجسام المضادة للفايروس وزيادة نسبتها في امصال الفئران المعالجه وهذا يشير الى سيطرة جسم الحيوان على تواجد الفايروس بالاضافه الى عدم تاثر فعل الفايروس المضاد للورم بهذا المستوى المتصاعد من الاجسام المضادة وكما في الشكل رقم 11 الذي يبين مستوى الفايروس في مصل الفئران المعالجه واستمرار التأثير التثبيطي وكما بينت التجارب السابقة.

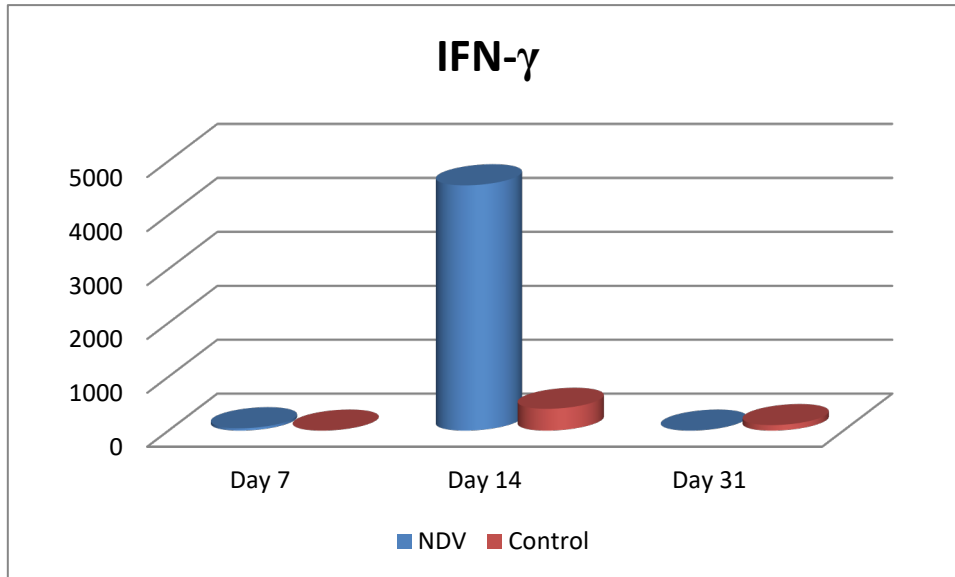


الشكل رقم 10 تطور الاجسام المضادة للفايروس وزيادة نسبتها في امصال الفئران المعالجه



الشكل 11 الذي يبين مستوى الفايروس في مصل الفئران المعالجة ونلاحظ ان المستوى في تصاعد رغم تزايد مستوى الاجسام المضاده للفايروس والذي ينعكس ايجابيا على الفعل المضاد للورم

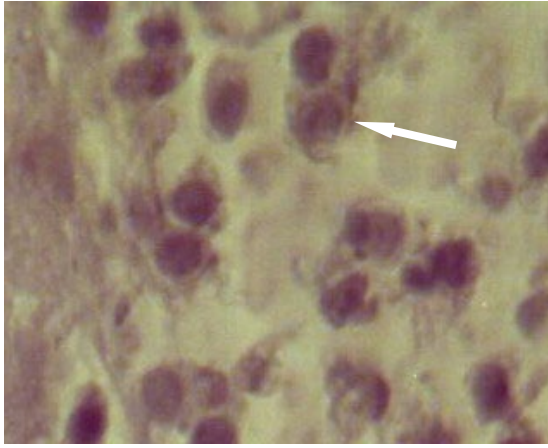
مستوى الوسائط الخلوية الانترفيرون في امصال الفئران المعالجه وغير المعالجه:
 اظهرت النتائج وكما في الشكل رقم 12 ان الفايروس حث الجسم على انتاج الوسيط المناعي المهم الانترفيرون نوع كاما والذي يلعب دورا مهما في تحفيز المناعه الخلوية لتهاجم الورم



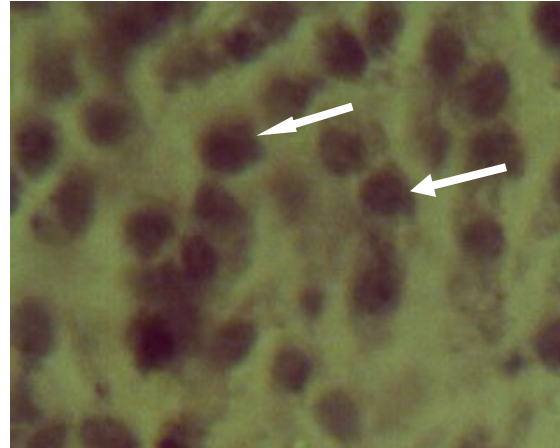
الشكل رقم 12 يبين ان الفايروس حث الجسم على انتاج الوسيط المناعي المهم الانترفيرون نوع كاما والذي يلعب دورا مهما في تحفيز المناعه الخلوية لتهاجم الورم

فحوصات الكيمياء المناعية النسيجية:

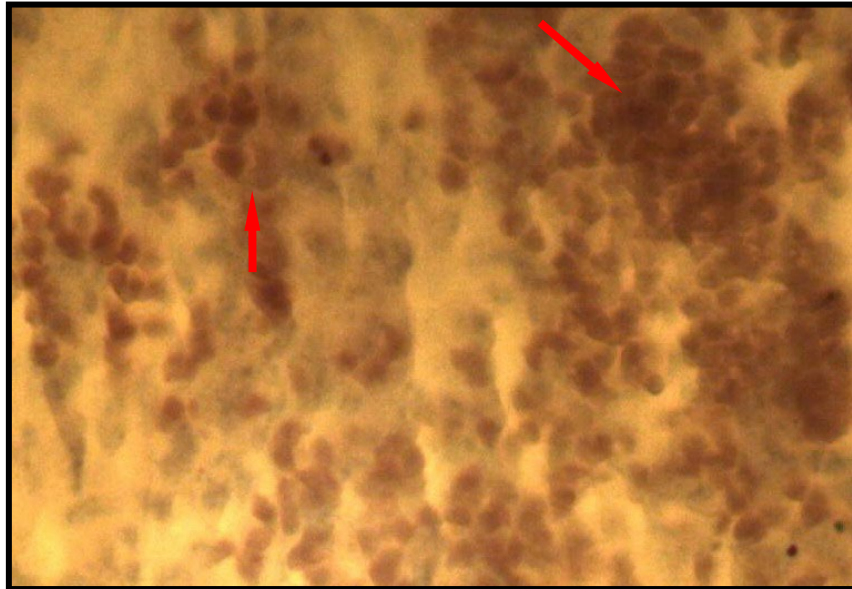
اظهرت الدراسة المناعية النسيجية ارتشاح الخلايا التائية القاتلة (صوره 74) والخلايا القاتله الطبيعية (صورة 75) في نسيج الاورام المعالجه مع وجود مستوى عالي من العامل الناخر للورم (صورة 76) وهذا دليل على دور فايروس النيوكاسل كمحفز مناعي والذي يزيد من القابلية المضادة للاورام لفايروس النيوكاسل العترة العراقية حيث نلاحظ ازدياد في نسبة الموت المبرمج وكما نشاهد في الصورة رقم 77 حيث يزداد التعبير للكاسبس ال12 caspase 12 وهو دلالة على دخوا الخلايا في مرحلة الموت المبرمج في حين لايلاحض في الانسجه الورمية غير المعالجه (صورة 78) وذلك في الانسجة الورمية المصابة بالفايروس والتي تظهر مستضدات فايروس النيوكاسل على سطحها وكما في الصورة رقم 79



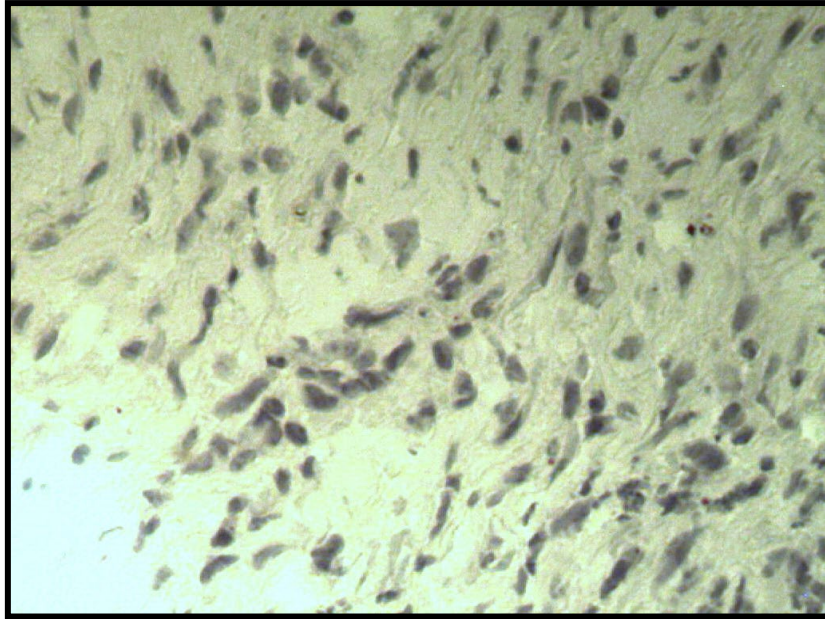
صورة 74 مقطع نسيجي في اورام معالجه توضح خلايا موجبة ل CD8 والتي تمثل ارتشاح الخلايا التائية السامة لموقع الورم بفعل فايروس النيوكاسل, قوة 400



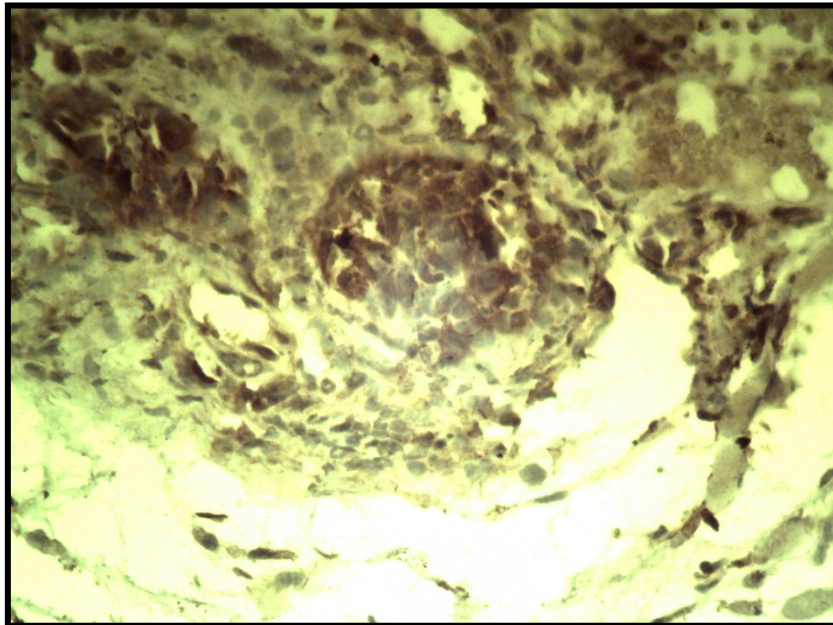
صورة 75 مقطع نسيجي في اورام معالجه توضح خلايا موجبة CD56 والتي تمثل ارتشاح الخلايا القاتله الطبيعيه لموقع الورم بفعل فايروس النيوكاسل, قوة 400



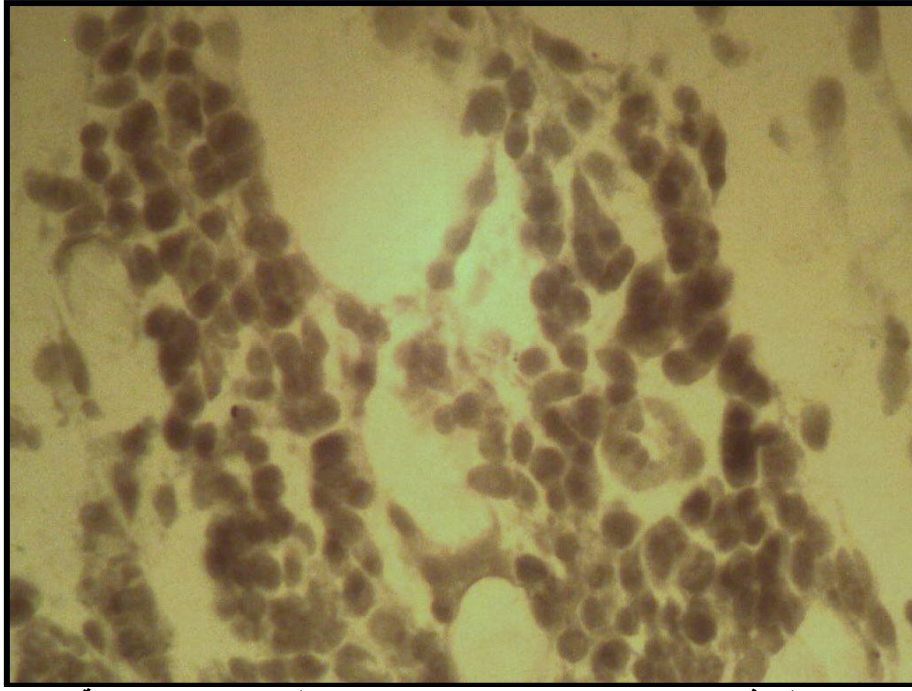
صورة 76 مقطع نسيجي في اورام معالجه توضح خلايا موجبة للعامل الناخر للورم بفعل فايروس النيوكاسل, قوة 400



صورة 77 توضح مقطع في ورم غير معالج ونلاحظ عدم وجود خلايا موجبة لـ Caspase 12



صورة 78 توضح مقطع في ورم معالج بفايروس النيوكاسل ونلاحظ وجود خلايا موجبة لـ Caspase 12 والتي توضح دخول الخلايا في الموت المبرمج نتيجة فعل الفايروس والتي تدعم صور المجهر الالكتروني



صورة 78 توضح مقطع في ورم معالج بفايروس النيوكاسل ونلاحظ وجود خلايا موجبة لـ Caspase 12 والتي توضح دخول الخلايا في الموت المبرمج نتيجة فعل الفايروس والتي تدعم صور المجهر الالكتروني

اثبات انتقائية الفايروس في استهداف الخلايا السرطانية دون الطبيعية :.

تم اجراء العديد من التجارب التي تثبت انتقائية الفايروس النيوكاسل العترة العراقية باتجاه الخلايا السرطانية وعدم اصابته للخلايا الطبيعية وكما يلي :

- 1- اصابة خلايا جنين الفار و جنين الجرذ بالفايروس ودراسة وجود المستضدات الخاصة بالفايروس بتقنية المناعية النسيجية Immunohistochemsitry حيث اثبتت النتائج عدم وجود خلايا موجبة للمستضد HN الخاص بالفايروس في حين كانت الخلايا السرطانية موجبة
- 2- تم عمل نفس التجربة في الفئران حيث تم حقن الفايروس في البريتون وفي داخل الورم وفي الدماغ بشكل مباشر ولم تلاحظ وجود تغيرات في الاعضاء الطبيعية ولم توجد خلايا موجبة لمستضدات الفايروس في الاعضاء الطبيعية للحيوان وكان الاصطباغ الموجب فقط في المقاطع النسيجية للاورام
- 3- في مقاطع المجهر الالكتروني النافذ اظهرت ان الفايروس يتكاثر ويتبرعم في الخلايا السرطانية في حين ان الخلايا الطبيعية لم تظهر اي تبرعم للفايروس
- 4- اظهرت التجارب الخاصة باستحداث الموت المبرمج apoptosis ان الفايروس لا يستحدث الموت المبرمج في الخلايا الطبيعية للفئران والجرذان في حين يستحدثها في الخلايا السرطانية جميعا وذلك في الخلايا المزروعه في المختبر وفي الفئران كذلك حيث لم يستحدث الموت المبرمج في الاعضاء الطبيعية في حين

يستحدث الموت المبرمج في الاورام المغروسة وكما اظهرت وجود تعبير لcaspase-12 والخاص باستحداث الموت المبرمج بطريق الشبكة الاندوبلازمية الداخلية

5- كما اظهرت الدراسات المشابهة عالميا على عتر مختلفه من الفايروس هذه الانتقائية وكما مثبت في المصادر التالية والعديد غيرها:

- Kirn, D. H. (2000). Replication–Selective microbiological agents: Fighting cancer with targeted germ warfare. The Journal of Clinical Investigation, 105 (7): 837-839.
- Phuangsab, A.; Lorence, R. M.; Reichard, K.W.; Peeples, M. E. and Walter, R. J. (2001). Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: anti tumor effects of local or systemic administration. Cancer letters, 172: 27 – 36.
- Nelson, N. J. (1999). Scientific Interest in Newcastle Disease Virus Is Reviving. Journal of the National Cancer Institute, 91 (20): 1708 – 1710.
- Nelson, N. J. (2000). Re: Scientific Interest in Newcastle Disease Virus Is Reviving. Journal of the National Cancer Institute, 92(6): 493-494

فحص استقرار العزلات جينيا واستخدام الفايروس على خلايا مختلفه يعتبر عامل ضغط على الاستقرار الجيني للفايروس مع ان الفايروس يعتبر مستقر جينيا

ان الدراسات التي قمنا بها للان تشجع على استعمال الفايروس من البيض المخصب وتنقيته ثم استعماله في العلاج وان استعمال الفايروس المكثر على الخلايا السرطانية سيكون في مراحل مستقبلية بعد اتمام اجراءات دراسة تسلسل القواعد النايتروجينية لجينوم الفايروس والتي هي قيد العمل حاليا حيث سيتم مقارنة جينوم الفايروس المعزول بالبيض مع الفايروس المعزول من تكاثر الفايروس على الخلايا السرطانية للاثبات الاستقرار الجيني وهذا سيكون قبل اي استعمال للفايروس في البشر او المرضى المصابين بالسرطان حيث اشار عملنا ان طلب الحماية الفكرية لعملا هو للاستمرار بالتجارب وصولا للاستعمال السريري ولكن الفايروس العترة العراقية التي ننوي نقلها للمراحل السريرية هي التي تكثر في البيض المخصب والتي لا يوجد عليها اي عامل ضغط على الاستقرار الجيني اي ان تكثير الفايروس في المضيف الطبيعي ثم اتقنته واستعماله في العلاج هو امر مسلم به علميا لايسبب اي تغير في طبيعة الفايروس والذي هو مستقر جينيا منذ ان تم اكتشافه في مطلع القرن ولم تسجل ولاحادثة واحدة تشير الى حدث طفرة في الفايروس سببت تغير خصائصه في اي دوله في العلم ومن خلال مراجعة كل النشريات العالمية.

التأكد من الفعل العلاجي:

تجاربنا التي امتدت على مدى 12 عام والتي مازلنا مستمرين بها اثبتت ومازالت تثبت الفعل المضاد للاورام وكل التجارب التي تم ذكرها في المتن سواء في المختبر على الخلايا السرطانية وعلى الاورام المغروسة في الفئران اظهرت واكدت النتائج وهنا نود ان نذكر ان التجارب تم اعاتها عشرات المرات وتم دراسة المسارات الخاصة باستحداث الموت المبرمج واظهرت احدى احدث دراساتنا باستعمال تقنية المصفوفات الدقيقة ان الفايروس يمتلك فعالية مضادة لنمو الاوعية الدموية والتي تمد الورم بالغذاء antiangiogenic وهذا يضاف

الى الخواص التي تم اثباتها وهي قتل الخلايا السرطانية بالتحلل المباشر وباستحداث الموت المبرمج وبالتحفيز المناعي الناتج من تغيير السطح المستضدي للخلايا السرطانية والتي تجعل تعرف الخلايا المناعية لها اسهل وكما تم اثباته في تجاربنا المذكورة.

المصادر:

- Stevens, A. and Lowe, J. (2000). Pathology, 2nd ed., Mosby, London, Pp: 79-104.
- Kirn, D. H. (2000). Replication–Selective microbiological agents: Fighting cancer with targeted germ warfare. The Journal of Clinical Investigation, 105 (7): 837-839.
- Nelson, N. J. (1999). Scientific Interest in Newcastle Disease Virus Is Reviving. Journal of the National Cancer Institute, 91 (20): 1708 – 1710.
- Nelson, N. J. (2000). Re: Scientific Interest in Newcastle Disease Virus Is Reviving. Journal of the National Cancer Institute, 92(6): 493-494.
- Abernathy, E. (2000). Principles of biotherapy and gene therapy. In: Nevidjon, B.M. and Sowers, K. W. (eds.). A Nurse's guide to cancer care. Pp.: 241-256. Lippincott, Philadelphia.
- Kirn, D. H. and McCormick, F. (1996). Replicating viruses as selective cancer therapeutics. Molecular Medicine Today, Pp: 519-527.
- Smith, E. R. and Chiocca, E. A. (2000). Oncolytic viruses as novel anticancer agent: Turning one scourge against another. Exp. Opin Invest . Drugs, 9 (2): 311-327.
- Schirmacher, V.; Haas, C.; Bonifer, R.; Ahlert, T.; Gerhards, R. and Ertel, C. (1999). Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. Gene therapy, 6: 63-73.
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Reviews in Science and Technology, 19 (2): 443-462.

- Bar-Eli, N., Giloh , H., Schlesinger , M. and Rones , Z. Z. (1996). Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells . *J. Cancer Res. Clin . Oncol .* , 122 : 409-415.
- Lamb, R. A. and Kolakofsky, D. (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B. N.; Knipe, D. M. and Howley, P. M. (eds.). *Fundamental Virology*, (3rd ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Pp.: 577 – 604.
- Takimoto, T.; Taylor, G. L.; Crennell, S. J.; Scroggs, R. A and Protner, A. (2000). Crystallization of Newcastle disease virus hemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein. *Virology*, 270: 208-214.
- Aldous, E. W. and Alexander, D. J. (2001). Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology*, 30: 117-128.
- DeLeeuw, O. and Peeters, B. (1999). Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: Evidence for the existence of a new genus within the subfamily paramyxovirinae. *Journal of General Virology*, 80: 131-136.
- Allan, W. H.; Lancaster, J. E. and Toth, B. (1978). Newcastle disease vaccines. Their Production and Use. FAO, Italy, Pp.: 1-9.
- Hayat, M.A. (1989). Principles and techniques of electron microscope. *Biological applications* (3rd. ed.). Macmilan Press Ltd., London.
- Ahlert, T. and Schirmacher, V. (1990). Isolation of a human melanoma adapted Newcastle disease virus mutant with highly selective replication patterns. *Cancer Research*, 50: 5962-5968.
- Lorence, R. M.; Katubig, B. B.; Reichard, K. W.; Reyes, H. M.; Phuangsab, A.; Sasseti, M. D.; Walter, R. J. and Peeples, M. E. (1994). Complete Regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Research*, 54(23): 6017-6021.
- Haas, C.; Ertel, C.; Gerhards, R. and Schirmacher, V. (1998). Introduction of adhesive and costimulatory immunefunctions in to tumor cells by infection with Newcastle disease virus. *International Journal of Oncology*, 13: 1105-1115.

- **Bell, D. M.; Roberts, N.J.; Madore, H.P.; Hall, C.B. and Simons, R.L. (1985). Hemadsorption focus assay for growth of influenza and parainfluenza viruses in human dermal fibroblasts (42112). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 179: 377-381.**
- **Grote, D.; Russell , S. J.; Cornu , T. I.; Cattaneo , R.; Vile, R.; Poland, G. A. and Fielding, A. K. (2001). Live attenuated measles virus induce regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. Blood, 97 (12): 3746-3754.**
- **Phuangsab, A.; Lorence, R. M.; Reichard, K.W.; Peeples, M. E. and Walter, R. J. (2001). Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: anti tumor effects of local or systemic administration. Cancer letters, 172: 27 – 36.**

المميزات:

- 1- استعمال فايروس النيوكاسل العترة الضارية العراقية لأول مرة محليا وعالميا كعلاج للسرطان.
- 2- فعالية العلاج في تحطيم الخلايا السرطانية في المختبر وفي الحيوانات المختبرية
- 3- ظروف الانتاج تتميز بالسهولة وقلة التكاليف مما توفر علاجا فعالا وقليل الثمن.
- 4- امان استعمال فايروس النيوكاسل العترة العراقية من خلال عدم احداثه لاعراض جانبية يشجع لاستعماله كعلاج وكناقل في العلاجات الجينية المستقبلية.
- 5- إن الانجاز المتميز هو في تطويع فايروس ممرض للدواجن ليكون علاجا فعالا لمرض مميت وهو السرطان وان التميز هو كون العترة عراقية معزولة من وسط العراق والنتائج من التجارب المختبرية تشجع على الانتقال للمرحلة السريرية اي تجريب العلاج على البشر.

الادعاءات:

- 1- إنتاج علاج جديد وفعال ضد السرطان.
- 2- الحصول على نتائج علاجية للاورام من حقنة واحدة ويمكن تكرار الحقن للحصول على نتائج طويلة الاثر.
- 3- امكانية حقن العلاج وريديا مع الحصول على نتائج جيدة حيث اثبتت النتائج امكانية وصول الفايروس للورم حتى في حالة وجود اضرار للفايروس مما يساعد في القضاء على النقيله (metastasis).
- 4- العلاج بفايروس النيوكاسل العترة العراقية لايسبب اعراض جانبية كالعلاج الكيماوي او الاشعاعي وهذا ماتم اثباته في التجارب حيث لايتكاثر الفايروس في الخلايا الطبيعية وانما فقط في الخلايا السرطانية ولايستحدث الموت المبرمج في الخلايا الطبيعية وانما فقط في الخلايا السرطانية وهذا من اهم ميزات العلاج.
- 5- التوصل من خلال المقاطع النسيجية وصور المجهر الالكتروني النافذ والتجارب المتعددة إلى ان الفايروس يقضي على الورم من خلال ثلاث اليات: الاولى هي بتحلل الخلايا وحدوث التنخر نتيجة لتكاثر الفايروس وتبرعمه من الخلايا السرطانية مما يؤدي الى موت الخلية الورمية. ثانيا من خلال استحداث الموت المبرمج. ثالثا من خلال التحفيز المناعي وذلك بتحويل السطح المستضدي للخلايا السرطانية وجعله اكثر تميزا من قبل خلايا الجهاز المناعي وبالتالي مهاجمة الجهاز المناعي للاورام.

- 6- الفايروس يستطيع القضاء على اغلب انواع الاورام من خلال التجارب السابقة التي اثبتت ان العلاج يستطيع تحطيم خلايا سرطان الغدة اللبينية وسرطان الدماغ كلايوبلاستوما وسرطان الخلية العظلية وسرطان الحنجرة وسرطان الخلية المغزليه المعدي وسرطان الخلية البلازمية وسرطان عنق الرحم.
- 7- ماذكر اعلاه مع رخص التصنيع تشجع على الانتقال الى المرحلة السريرية.