



IQ (19)

جمهورية العراق

وزارة التخطيط والتعاون الانساني

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية
قسم الملكية الصناعية

براءة اختراع

(12)

(51) التصنيف الدولي
A61D7/00

(11) رقم البراءة : 3345

C12N5/00

(21) رقم الطلب : 2010/139

(52) التصنيف العراقي 1

(22) تاريخ تقديم الطلب : 2010/5/5

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

(45) تاريخ منح البراءة : 2011/10/23

الجامعة المستنصرية / المركز العراقي
ليحورث السرطان والوراثة الطبية

(72) اسم المخترع وعنوانه : د. احمد مجيد حمزة الشمري
د. ناهي يوسف ياسين

IRAQ

(73) اسم صاحب البراءة : الذوات الملاء

(74) اسم الوكيل :

(54) تسمية الاختراع : خط خلايا سرطان الغدة اللبنية القابل للغرس في الفئران (An3)

منحت هذه البراءة استنادا لاحكام المادة 21 من قانون
براءات الاختراع والنماذج الصناعية رقم 65 لسنة
1970 وعلى مسؤولية المخترع .

سعد محمد هادي عبد القادر

بيع المسجل
بمساعدة الجهاز

خط خلايا سرطان الغدة اللبنية القابل للغرس في الفئران (AN3)

**AN3 – Transplantable murine mammary
adenocarcinoma tumor line**

الباحثون:

د.أحمد مجيد حمزة أشمري

د.ناهي يوسف ياسين

أجامعه المستنصرية / المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية

الموجز:

فكرة الاختراع هي إنتاج خط خلايا سرطانية متكيف للغرس والنمو في الفئران ليكون نموا ورميا خلال 10-14 يوم بعد غرس الخلايا السرطانية تحت الجلد حيث يمكن الحصول على العدد المطلوب من الفئران الحاملة للورم والتي تستعمل كنماذج مشابهة للبشر المصابين بالأورام واستعمال تلك الحيوانات المصابة بالورم في التجارب العلاجية عند تجربة علاجات جديدة حيث يمكن هذا الخط المنتج من قبلنا من الحصول على أعداد كبيرة من الحيوانات المصابة بالأورام في وقت واحد وبوقت قصير وبتجانس ومن أصل واحد وهذا مما يساعد في تسريع اكتشاف علاجات جديدة للسرطان حيث يعد هذا الخط السرطاني القابل والمتكيف للغرس الأول من نوعه في العراق ويحمل صفات فريدة تميزه عالميا كونه يحمل الصفات الإفرازية للحليب كما اثبتت صورة المجهر الالكتروني النافذ أي إن الورم مازال يحمل صفات النسيج الأصلي للغده اللبنية وهذا ما يجعله النموذج المثالي لدراسة سرطان الثدي عند النساء ودراسة واكتشاف أدوية جديدة لسرطان الثدي. وهذا الخط الورمي متوفر في جميع الأوقات حيث تم تخزينه بالنيتروجين السائل ويمتلك صفة الخلود أي التكاثر إلا منتهي. يستخدم هذا الخط الورمي القابل للغرس في الفئران والمسمى (AN3) كنموذج حيواني للأورام البشرية لتطوير وفحص العقارات الجديدة المضادة للأورام (العلاج الكيميائي، الإشعاعي والحيوي). كما يمكن أن يكون مفيدا للدراسات المرضية والحيوية عن الأورام.

مقدمة:

القليل من مرضى السرطان يستفيدون من العلاج الكيميائي أو الإشعاعي والأغلبية لا تظهر أي استجابة لتوقف نمو الورم نتيجة العلاج والأكثر من ذلك تظهر لديهم أعراض التسمم من الأدوية التي يستعملوها، والبعض قد يموت من تأثيرها ولهذا ظهرت حاجة ملحة لطريقة لقياس الدواء الأكثر فاعلية لتوقف نمو الورم في الحيوانات المختبرية قبل استعماله في البشر. حيث يمكن ملاحظة فاعلية الأدوية من خلال مراقبة نمو الورم المغروس في الحيوانات المختبرية. تم استخدام العديد من النماذج الحيوانية للأورام المتكيفة للغرس في اختبار وتطوير الأدوية المضادة للأورام. تستخدم أورام الحيوانات عند عمل تجارب واسعة للكشف عن الأدوية المضادة للأورام وهي ذات فائدة سريريته.

استخدمت الأورام المغروسة في الحيوانات بشكل مكثف في الأبحاث لتشبيه الظروف في البشر، حيث توفر التداخل بين الخلايا وبين المضيف والخلية. كما يمكن الحصول على أعداد كبيرة بنفس الحجم وبنفس معدل النمو وبنفس الموقع لإغراض التجارب العلاجية. المركبات التي تظهر فعالية في التجارب على الأورام المغروسة في الفئران وجد أنها تظهر تأثير مشابه من حيث الفعالية المضادة للأورام عند استعمالها سريريا على مرضى سرطانات الدم والأورام الصلبة. بشكل عام، نماذج الأورام الحيوانية يمكن أن تنقسم إلى شكلين: التي تظهر بشكل طبيعي وتلك التي يتم غرسها اصطناعيا. يتم غرس الأورام الصلبة عادة بحقن عالق الخلايا الورمية تحت الجلد أو في الجلد كما يمكن داخل العضلة أو في منطقة الخلب أو وريديا. أن الأورام التي تظهر طبيعيا تكون نادرة والأورام المستحدثة بالمواد الكيماوية المسرطنة تحتاج وقت طويل ولا تظهر بنفس الوقت ولا بنفس الحجم.

أن الهدف من هذا العمل هو إنتاج نموذج ورمي حيواني يمكن غرسه بسهولة في الفئران ويستعمل في اختبار الأدوية المضادة للأورام الجديدة وتطويرها في العراق وذلك لعدم وجود أورام متكيفة للغرس في الفئران في العراق سابقا، بالإضافة إلى أهميتها في الدراسات المرضية والحيوية للأورام.

طرق العمل:

الفئران: تم استعمال فئران نوع BALB/C بعمر 6-10 أسابيع وتم تربيتها في البيت الحيواني. التخفيض المناعي للفئران: في بداية تطبيع الخلايا للنمو في الفئران تم القيام بعملية التثبيط المناعي لغرض تقليل الرفض 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 من ورم نشأ تلقائيا في فأرة أنثى مسنة (صورة رقم واحد) في جميع الفئران المثبطة مناعيا.



صورة رقم 1- تظهر الفأرة التي نشأ الورم فيها وتم استعمالها كمصدر للخلايا الورمية التي تم تحويلها لاحقا الى الخط الورمي المتكيف للغرس

غرس الورم:

عملية الغرس الأولى تمت بإزالة الورم جراحيا من الفأرة المصابة وتقطيعه إلى قطع صغيرة بحجم 3-5 ملم ومن ثم تم عمل فتحة جراحية في منطقة الظهر وتم إدخال قطع الورم فيها في تلك الحيوانات المخفضة مناعيا ومن ثم تم خياطة الجرح بخيوط جراحية وأبقيت الحيوانات تحت الرعاية والمراقبة المستمرة.

بعد نجاح عملية الغرس الأولى تم تطوير تقنية خاصة وسريعة للغرس في التمريرات اللاحقة في الفئران حيث يتم شطف الخلايا الورمية عن طريق إدخال إبرة محقنة طبية حجم 21 في الورم وشطف الخلايا ثم نقلها إلى المختبر حيث تغسل الخلايا بشكل معقم ثلاث مرات بمادة RPMI ومن ثم تعلق الخلايا بمقدار 1000000 خلية في الملي لتر الواحد وتحقن في الحيوانات بمنطقة الظهر عن طريق إدخالها من منطقة الذيل وصولا إلى أعلى الرقبة تحت الجلد وذلك لمنع خروج العالق الخلوي. بعد نجاح نمو الأورام في الفئران المغروسة تم الاستغناء عن عملية التخفيض المناعي وذلك بعد حصول تطبع الخلايا الورمية على النمو في المضيف الجديد

تم قياس معدل نمو الأورام عن طريق احتساب طول مضروبا في العرض مقسوما على اثنان

$$\text{tumor volume} = a.b/2$$

Where a: the length, b: the width.

الفحوصات النسيجية:

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

المجهر الالكتروني:

تم اخذ عينات من الأورام وحفظت في مثبت خاص glutaraldehyde لمدة يوم كامل ثم تمت معاملتها لغرض تهيئتها للتصوير بالمجهر الالكتروني النافذ Philips CM10 transmission electron microscope

التحليل الوراثي:

تم اخذ عينات من الغرسات المتعاقبة لغرض التحليل الوراثي بفحص التغيرات العددية بالكروموسومات

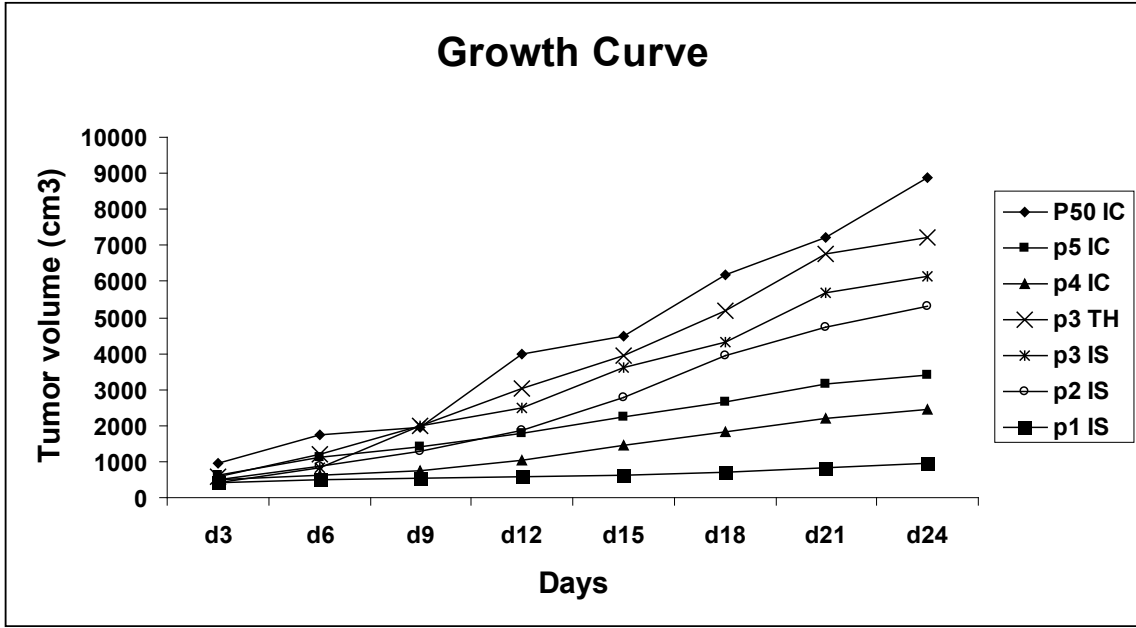
النتائج:

معدل نجاح نمو الغرس في الفئران:

في الغرس الأولى نجح الورم في النمو في اثنان من أصل عشرة فئران مغروسة مخفضة مناعيا وذلك بعد مرور فترة شهرين على الغرس في حين في الغرس الثانية التي تم اخذ الخلايا الورمية فيها من الغرس الناجحة الأولى فقد نما الورم في 37 فأر مخفض مناعيا من اصل خمسين أي بمعدل 74% وذلك بعد مرور 18-20 يوم بعد الغرس. بعد ذلك تم اخذ خلايا من الغرس الناجحة الثانية وعرسها للمرة الثالثة في مجموعه جديدة من الحيوانات المخفضة مناعيا وهنا كانت نسبة النجاح بمعدل 100 % وهنا تم اخذ خلايا منها وعرست للمرة الرابعة في حيوانات سليمة غير مخفضة مناعيا وهنا كانت نسبة نمو الورم 40% وكان نمو الورم بعد 10-12 يوم من الغرس ثم أعيدت التجربة على التوالي في فئران سليمة غير مخفضة مناعيا لأكثر من ثلاثين غرسه متتالية وعلى مدى 6 سنوات حيث أصبح معدل نجاح نمو الغرس يصل إلى 90-100% في الفئران السليمة.

معدل نمو حجم الورم:

تم اخذ قياسات لجميع الأورام الناجحة في الغرس وتم حساب معدل تضاعف نمو الورم وكان معدل تضاعف نمو الورم هو 15 يوم وكما موضح في الشكل رقم 2



شكل رقم 2- معدل نمو حجم الورم

- P1: first passage in immunosuppressed mice**
P2: second passage in immunosuppressed mice
P3 IS: third passage in immunosuppressed mice
P3 TH: third passage in Thymectomized mice
P4 IC: fourth passage in immunocompetent mice
P5 IC: fifth passage in immunocompetent mice
P 50 IC: Passage fifty in immunocompetent mice

الفحص العياني:

يبدأ نمو الورم كعقدة صغيرة محسوسة تحت الجلد في منطقة الغرس والتي تتطور إلى كتلة ورمية كبيرة تؤدي إلى موت الحيوان خلال شهرين من الغرس حيث تصل إلى حجم كبير جدا وكما في الشكل رقم 3 و4 كما اظهر الفحص التشريحي وجود إفرازات حليبية القوام.



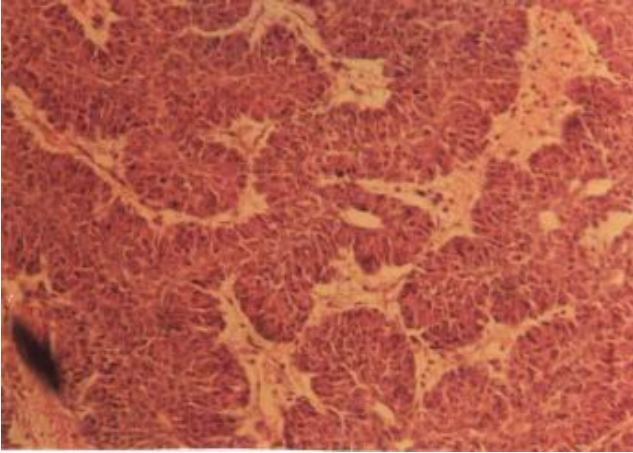
شكل رقم-3 ويظهر النمو الورمي الكبير في
فأر من التمرير الثاني



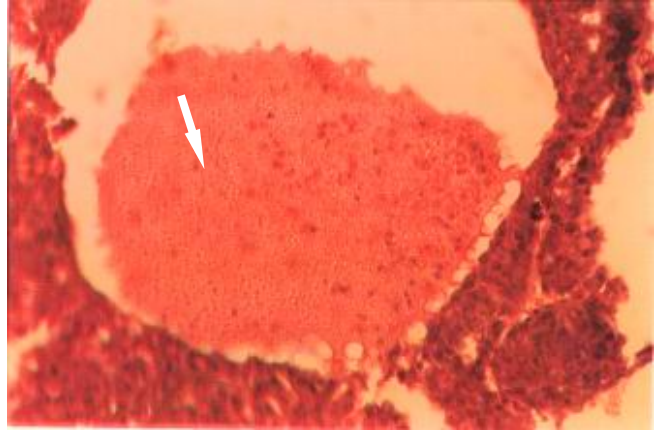
شكل رقم- 4 يمكن رؤية النمو الورمي تحت الجلد متخذاً
الشكل العقدي الغدي

الفحص النسيجي:

اظهر الفحص النسيجي لكل الأورام المغروسة في الغرسات المتعاقبة شبيها بالنسيج الأصلي الذي اتخذ التركيب الغدي لسرطانة الغدة اللبنية ووجود التشكلات الإصبعية والتمايز الضعيف مع وجود الشكل الغدي المميز وكما في الشكل رقم 5 مع وجود سدى مختلف الكثافة وتشكل دموي جيد. مع وجود الاسناخ الإفرازية وكما موضح في الشكل رقم 6



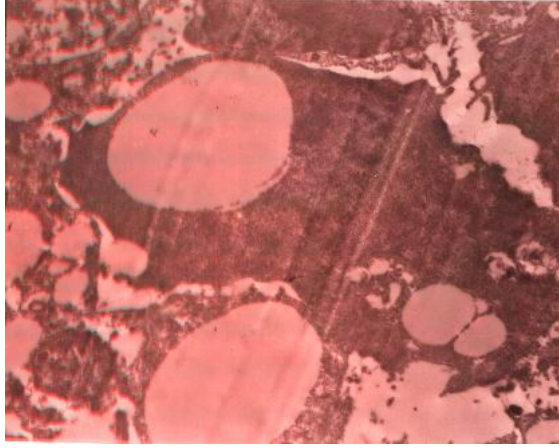
شكل رقم -5 يوضح التركيب الغدي للورم والمميز لكل الغرسات
المتعاقبة وعلى مدى ستة سنوات



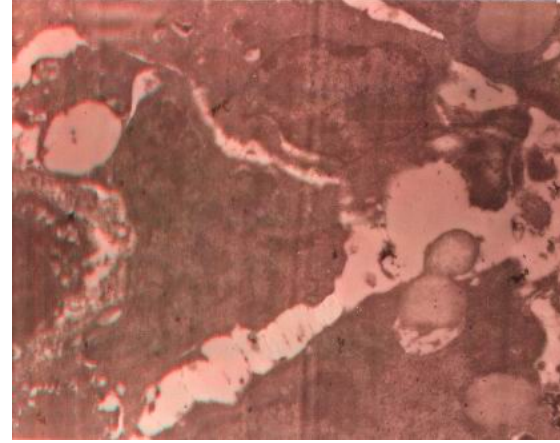
شكل رقم 6 يوضح التركيب السنخي الإفرازي للمواد الشبيهة
بالحليب

المجهر الالكتروني

اضهرت الدراسة للتركيب المستدق وجود الحويصلات الإفرازية في داخل هيولي الخلايا السرطانية مع وجود الكروماتين المتكثف وكما في الأشكال 7 و8.



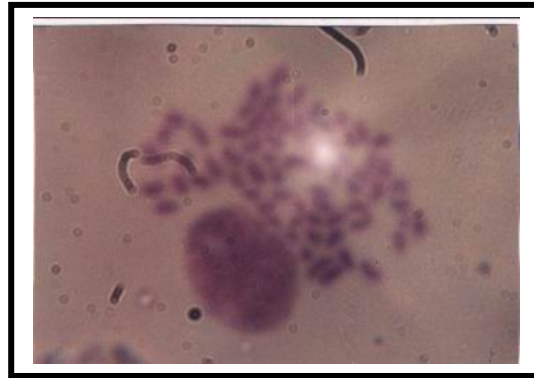
شكل رقم 7 ونلاحظ كبر حجم الحويصلات الإفرازية في هيولي الخلايا السرطانية



شكل رقم 8 ويحظ الإفراز من الحويصلات

التحليل الوراثي

اظهر التحليل الكروموسومي وجود زيادة في أعداد الكروموسومات مما يثبت الأصل الورمي كما في 9



شكل 9- يلاحظ الزيادة في أعداد الكروموسومات

المميزات:

- 1- تم إنتاج هذا الخط ليكون الأول من نوعه في العراق كخط خلايا سرطانية متكيف وممكن غرسه بسهولة في حيوانات سليمة لتصبح حيوانات مصابة بالسرطان للغدة اللبنية.
- 2- لا يحتاج الحيوان إلى أي معاملة خاصة لأن الخط الخلوي تم تكيفه على الزرع والغرس في الفئران السليمة.
- 3- هنا أصبح هذا الخط كنموذج ورمي يساعد في تقييم فعالية الأدوية المضادة للأورام. حيث يمكن تطوير الأدوية الجديدة والعلاجات الواعدة عن طريق تقييم كلا من كفاءتها كعامل مضاد للورم وتقييم سميتها على جسم الحيوان في نفس الوقت وذلك بدون تعريض حيات الإنسان إلى الخطر.
- 4- من الفوائد المهمة هو إن هذا النموذج الورمي يمكن أن يستعمل في دراسة وفهم طبيعة الأورام السرطانية مع دراسة آليات انتقالها وانتشارها داخل جسم الكائن الحي.
- 5- إن الانجاز المتميز هو من خلال تطويع الخلايا على النمو في جسم غريب عنها عن طريق تنميتها في حيوانات مخفضة مناعياً لتقليل الرفض المناعي ومن ثم تطبيعها للنمو في الفئران السليمة ليصبح متكيفاً على النمو وبسرعة ليوفر النموذج المرغوب في الدراسات المختلفة

الادعاءات:

- 1- إنتاج خط خلايا سرطانية متكيف للغرس والنمو في الفئران.
- 2- الحصول على نمو ورمي بعد غرس الخلايا السرطانية تحت الجلد في الفئران خلال 10-14 يوم.
- 3- إمكانية تجربة النمو الورمي المشار إليه في 2 للاستخدام كنماذج في التجارب العلاجية للأورام السرطانية وعلى أعداد كبيرة في وقت واحد قصير وحجم متجانس ومن أصل واحد.
- 4- كانت النتائج المستحصلة من الادعاء 3 المساعدة في تسريع اكتشاف علاجات جديدة للسرطان وخاصة سرطان الثدي كونه يحمل بعض الصفات المهمة كصفة إفراز مادة شبيهة بالحليب.
- 5- التوصل من خلال المقاطع النسيجية وصور المجهر الالكتروني النافذ إلى ان الورم السرطاني مازال يحمل صفات النسيج الأصلي للغدة اللبنية مما يؤهل لدراسة سرطان الثدي عند النساء واكتشاف الأدوية العلاجية الخاصة بذلك.
- 6- اكتساب خط الخلايا صفة الخلود وذلك باستمرار الغرس المتوالي في الفئران ولأكثر من 60 تمريره على مدى 8 سنوات للان.
- 7- استخدام الخط الورمي القابل للغرس في الفئران موضوع الاختراع AN3 كنموذج حيواني للأورام البشرية لتطوير وفحص العقارات الجديدة (العلاج الكيماوي والاشعاعي والحيوي) إضافة غالى الاستفادة منه في الدراسات المرضية والحيوية والفلسجية وكما بين في المفصل والأشكال المرفقة.