

Evaluation of the antitumor effects of Echovirus in combination with Doxorubicin in a mouse model of breast cancer

Fatemeh Aminian¹, Hadi Esmaeili Gouvarchin Ghaleh², Nahid Babaei¹, Gholamreza Khamisipour³,
Mahdieh Farzanehpour²

¹Department of Molecular Cell Biology and Genetics, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran

²Applied Virology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Department of Hematology, School of Paramedicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 27 May 2024

Revised: 12 Nov 2024

Accepted: 18 Nov 2024

ePublished: Apr 29 2025

Keywords:

- 4T1 cell line
- Breast cancer
- Echovirus
- Doxorubicin
- Synergistic effects

Abstract

Background. Breast cancer is the most common type of cancer and a leading cause of cancer-related death among women globally. Standard treatments for this disease include radiation therapy, surgery, and chemotherapy. Doxorubicin is currently the most effective chemotherapy drug for breast cancer. However, the side effects of these treatments have prompted researchers to explore alternative methods such as the use of oncolytic viruses or combination therapies. This study aimed to assess the anti-tumor effects of *Echovirus* and Doxorubicin use in a mouse model of breast cancer.

Methods. After inducing breast cancer, the mice were randomly divided into 4 equal groups. Then, the mice were treated twice with a one-week interval using Doxorubicin with and without *Echovirus*. The measurements included tumor volume, survival rate, interferon-gamma (IFN- γ), interleukin (IL)-10, IL-4, and transforming growth factor beta (TGF- β) production rate, nitric oxide (NO) production rate, and lactate dehydrogenase (LDH) release by splenocytes.

Results. In the present study, it was found that the tumor volume as well as the production levels of IL-4, IL-10, and TGF- β cytokines decreased significantly in mice treated with a combination of Doxorubicin and *Echovirus*, compared to groups treated with single agents or the control group. Additionally, the survival rate, IFN- γ cytokine production, as well as the production of NO and LDH, significantly increased in the group receiving the combined treatment compared to the other treatment and control groups.

Conclusion. According to the findings of this study, combining Doxorubicin with *Echovirus* may enhance its effectiveness, necessitating clinical trial studies.

Practical Implications. The results of this study indicate that the combination of *Echovirus* with Doxorubicin could be utilized as a new therapeutic strategy in cancer treatment. Therefore, it is recommended that researchers and physicians engage in the design and implementation of clinical trials to evaluate the effects of this combination in cancer patients. These trials can help identify optimal dosages, assess safety, and investigate potential side effects, ultimately leading to the development of more effective treatment protocols for patients.

How to cite this article: Aminian F, Esmaeili Gouvarchin H, Babaei N, Khamisipour G, Farzanehpour M. Evaluation of the antitumor effects of Echovirus in combination with Doxorubicin in a mouse model of breast cancer. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(2):168-178. doi: 10.34172/mj.025.33711. Persian.

*Corresponding author; Email: Nahid.babaei@yahoo.com

© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

Breast cancer is the most prevalent type of cancer diagnosed among women worldwide and stands as a leading cause of cancer-related mortality. Standard treatment modalities for breast cancer typically encompass a combination of radiation therapy, surgical interventions, and chemotherapy. Among the various chemotherapeutic agents available, Doxorubicin has emerged as the most effective drug for treating breast cancer, known for its ability to target rapidly dividing cancer cells. The adverse effects of Doxorubicin have led researchers to seek alternative therapeutic approaches that could enhance treatment efficacy while minimizing toxicity. One promising avenue of research involves the use of oncolytic viruses that selectively infect and kill cancer cells without harming normal tissues. This innovative strategy could transform cancer treatment by utilizing the immune response to better target tumors, and the study evaluates the anti-tumor effects of *Echovirus* and Doxorubicin in a mouse model of breast cancer.

Methods

After successfully inducing breast cancer in the mice, the mice were randomly divided into 4 equal groups to ensure unbiased treatment allocation and to facilitate a comprehensive analysis of the therapeutic effects. Each group was assigned a specific treatment regimen to evaluate the efficacy of Doxorubicin, both in isolation and in combination with *Echovirus*. The treatment protocol involved administering the drugs twice, with a one-week interval between doses, allowing for adequate time to assess the immediate and cumulative effects of the therapies on tumor progression. To monitor the outcomes of the treatments, several critical measurements were taken throughout the study. One of these measurements was tumor volume, which serves as a primary indicator of tumor growth and response to therapy. Additionally, the survival rate of the mice was closely monitored, providing insights into the overall effectiveness of the treatment strategies in prolonging life. Furthermore, the study aimed to evaluate the production rates of key cytokines, including interferon-gamma (IFN- γ),

interleukin (IL)-10, IL-4, and transforming growth factor beta (TGF- β). These cytokines play crucial roles in modulating the immune response and tumor microenvironment, and their levels can provide valuable information regarding the immunological effects of the treatments. In addition to cytokine analysis, the production rate of nitric oxide (NO) was measured, as it is an important signaling molecule involved in various physiological and pathological processes, including immune responses and tumor progression. Lastly, the release of lactate dehydrogenase (LDH) by splenocytes was assessed, as elevated levels of LDH can indicate cellular damage and cytotoxicity, offering further insight into the impact of the treatments on immune cells. By systematically analyzing these parameters, the study aimed to provide a comprehensive understanding of the anti-tumor effects of Doxorubicin and *Echovirus*, contributing to the development of more effective cancer therapies.

Results

In the present study, a comprehensive analysis was conducted to evaluate the effects of various treatment regimens on tumor growth and immune response in a mouse model of breast cancer. The results revealed that the tumor volume, which serves as a critical indicator of cancer progression, exhibited a significant reduction in mice that were treated with the combination of Doxorubicin and *Echovirus*. This decrease in tumor volume was particularly noteworthy when compared to the groups that received either of the single agents alone or the control group that did not receive any treatment. Moreover, the production levels of several key cytokines, especially IL-4, IL-10, and TGF- β , were assessed in the study. These cytokines are known to play pivotal roles in regulating immune responses and tumor microenvironments. The findings indicated that the levels of these cytokines decreased significantly in the mice treated with the combined therapy. This reduction suggests that the combination of Doxorubicin and *Echovirus* may enhance the ability of the immune system to combat tumor growth more effectively than either

treatment alone. In addition to the observed decreases in tumor volume and cytokine production, the study also highlighted a marked improvement in the survival rate of the mice receiving the combined treatment. This increase in survival is a critical outcome, as it underscores the potential of this therapeutic approach to not only inhibit tumor growth but also to extend the lifespan of affected individuals. Furthermore, the production of IFN- γ , a cytokine that is crucial for activating immune responses against tumors, was significantly elevated in the group that received the combined treatment. This increase in IFN- γ production is indicative of a more robust immune response, which may contribute to the observed therapeutic benefits. The study also measured the production of NO and LDH, both of which are important markers in assessing cellular activity and health. The results showed a significant increase in the production of both NO and LDH in the group receiving the combined treatment compared to the other treatment and control groups. Elevated levels of NO are often associated with enhanced immune activity, while increased LDH release can indicate effective cytotoxic activity against tumor cells.

Overall, these findings suggest that the combination of Doxorubicin and *Echovirus* not only effectively reduces tumor volume and alters cytokine production but also enhances survival rates and boosts immune responses in the treated mice.

Conclusion

According to the findings of this study, the combination of Doxorubicin with *Echovirus* has shown promising potential to enhance the effectiveness of cancer treatment. The results indicate that this innovative approach may not only improve tumor response but also positively influence various immune parameters, suggesting a synergistic effect between the two agents. Given the significant improvements observed in tumor volume reduction, cytokine production, and overall survival rates in the treated mice, there is a compelling rationale for further investigation into this combination therapy. The encouraging outcomes from this preclinical study highlight the need for clinical trial studies to evaluate the safety, efficacy, and optimal dosing of Doxorubicin combined with *Echovirus* in human subjects.

ارزیابی اثرات ضد توموری اکوویروس به همراه دوکسوروبیسین در مدل موش سرطان پستان

فاطمه امینیان^۱، هادی اسمعیلی گورچین قلعه^۲، ناهید بابایی^{۳*}، غلامرضا خمیسی پور^۳، مهدیه فرزانه پور^۳

^۱گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر، بوشهر، ایران
^۲مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، پژوهشکده فناوری های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
^۳گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

چکیده

زمینه. سرطان پستان به عنوان شایع ترین بدخیمی و اصلی ترین علت مرگ و میر ناشی از بدخیمی ها در میان زنان در جهان شناخته شده است. درمان های رایج برای این بیماری شامل پرتودرمانی، جراحی و شیمی درمانی است. دوکسوروبیسین در حال حاضر به عنوان مؤثرترین داروی شیمی درمانی برای درمان سرطان پستان به کار گرفته می شود. با این حال، عوارض جانبی ناشی از این روش های درمانی، پژوهشگران را به سمت جستجوی روش های جایگزین مانند استفاده از ویروس های انکولیتیک یا درمان های ترکیبی سوق داده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد توموری اکوویروس به همراه دوکسوروبیسین در مدل موشی سرطان پستان می باشد.

روش کار. بعد از القای مدل سرطان پستان، موش ها به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم بندی شدند و دو بار به فاصله یک هفته تحت درمان با دوکسوروبیسین با و بدون اکوویروس قرار گرفتند. سپس، حجم تومور، میزان بقا، میزان تولید سایتوکاین های IFN- γ ، IL-10، IL-4 و TGF- β ، میزان تولید نیتریک اکساید و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز توسط سلول های طحالی اندازه گیری شد.

یافته ها. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حجم تومور، سطح تولید سایتوکاین های IL-4، IL-10 و TGF- β در موش های دریافت کننده دوکسوروبیسین به همراه اکوویروس (درمان ترکیبی) در مقایسه با گروه های دریافت کننده تک عاملی و کنترل کاهش معناداری را نشان داد. همچنین، میزان بقا، سطح تولید سایتوکاین IFN- γ ، تولید نیتریک اکساید و لاکتات دهیدروژناز در گروه درمان ترکیبی افزایش معناداری نسبت به سایر گروه های درمانی و کنترل داشت.

نتیجه گیری. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می رسد استفاده از اکوویروس به عنوان مکمل به همراه داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین می تواند اثرگذاری آن را افزایش دهد و این امر نیازمند انجام مطالعات کارآزمایی بالینی می باشد.

پیامدهای عملی. نتایج این مطالعه نشان می دهد که ترکیب اکوویروس با دوکسوروبیسین می تواند به عنوان یک استراتژی درمانی جدید در درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، پیشنهاد می شود که محققان و پزشکان به طراحی و اجرای کارآزمایی های بالینی بپردازند تا اثرات این ترکیب را در بیماران مبتلا به سرطان ارزیابی کنند. این کارآزمایی ها می توانند به شناسایی دوزهای بهینه، ارزیابی ایمنی و بررسی تأثیرات جانبی احتمالی کمک کنند و در نهایت به توسعه پروتکل های درمانی مؤثرتر برای بیماران منجر شوند.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۳/۷
اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۸/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۲۸
انتشار برخط: ۱۴۰۴/۲/۹

کلیدواژه ها:

- رده سلولی 4T1
- سرطان پستان
- اکوویروس
- دوکسوروبیسین
- اثرات هم افزایی

مقدمه

سرطان پستان، رشد و تقسیم کنترل نشده سلول های بافت پستان است^۱ و شایع ترین بدخیمی در میان زنان جهان و همچنین اصلی ترین علت مرگ و میر ناشی از بدخیمی ها در این گروه محسوب می شود.^۲ در حال حاضر، از روش های درمانی مختلفی مانند هورمون درمانی، پرتودرمانی، جراحی و شیمی درمانی برای درمان سرطان پستان استفاده می شود.^{۳،۴}

دوکسوروبیسین از خانواده آنتراسایکلین بوده و در حال حاضر مؤثرترین داروی شیمی درمانی است که برای درمان سرطان پستان

سرطان پستان، رشد و تقسیم کنترل نشده سلول های بافت پستان است^۱ و شایع ترین بدخیمی در میان زنان جهان و همچنین اصلی ترین علت مرگ و میر ناشی از بدخیمی ها در این گروه محسوب می شود.^۲ در حال حاضر، از روش های درمانی مختلفی مانند

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Nahid.babaei@yahoo.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی رایت کامنز 4.0 CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

آن را به اولین ویروس انکولیتیک تبدیل کرد که تأییدیه نظارتی را در هر نقطه از جهان دریافت کرد.^{۱۷} هدف از این بررسی ارزیابی اثرات ضدتوموری /کوویروس به همراه دوکسوروبیسین در مدل موشی سرطان پستان می باشد.

روش کار

سلول های 4T1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS در فلاسک T25 و در انکوباتور (دماي ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO2) کشت داده شدند. جهت القای مدل توموری از موش های ماده نژاد BALB/c با محدوده سنی ۸-۶ هفته که از انستیتو پاستور تهیه شده بود، استفاده گردید. این موش ها قبل از اینکه تحت تزریق رده سلولی قرار بگیرند، دو هفته در آزمایشگاه حیوانات نگهداری شدند تا از نظر بیولوژیکی، با شرایط محیطی سازگار شوند. سپس با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته ملی اخلاق کشوری،^۴ تعداد ۱۰ سلول توموری زنده در ۵۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین (PBS) به فلانک چپ موش ها به صورت زیر جلدی تزریق شد و حجم روزانه تومور هر موش از طریق فرمول زیر محاسبه و ثبت شد.^{۱۸}

$$\frac{5236}{100} \times \text{ارتفاع} \times \text{عرض} \times \text{طول} = \text{حجم تومور}$$

بعد از مشاهده تومور قابل لمس، موش ها به ۴ گروه مساوی (۱۰ سر موش در هر گروه) تقسیم بندی شدند. سپس گروه های اول تا چهارم به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر PBS، کوویروس (۱۰^۶ TCID₅₀/ml)، دوکسوروبیسین (۱۰ mg/kg) و درمان ترکیبی (دوکسوروبیسین و کوویروس) را دو بار به فاصله یک هفته به صورت داخل توموری دریافت کردند. دو هفته بعد از آخرین تزریق نصف موش ها جهت بررسی های آزمایشگاهی یوتانایز و نصف دیگر جهت بررسی میزان بقا نگهداری شدند.^{۱۸،۱۹}

کشت سلول های طحالی و سنجش سایتوکاین ها در مایع رویی آنها

روز نمونه برداری مطالعه، موش ها تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند (کتامین ۱۰۰mg/Kg و زایلازین ۱۰mg/Kg، داخل صفاقی). پس از بیهوشی، بلافاصله طحال موش ها تحت شرایط استریل خارج و طبق مطالعه جعفری و همکاران^{۱۸} سلول های طحالی آنها جهت تهیه مایع رویی کشت داده شدند. به طور خلاصه، ۲×۱۰^۶ سلول طحالی در پلیت ۲۴ خانه و در حضور ۲۰μg/ml آنتی ژن 4T1 به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس مایع رویی حاصل جمع آوری و میزان تولید سایتوکاین های IFN-γ، IL-4، IL-10 و

استفاده می شود.^{۲۰} مکانیسم های عمل اصلی آنتراسایکلین ها شامل مهار توپوایزومراز II و تشکیل رادیکال های آزاد است.^۱ مکانیسم های مقاومت سلول های سرطانی پستان برای دوکسوروبیسین شناسایی شده اند که شامل سطوح افزایش یافته در بیان توپوایزومراز II است.^۲ عوارض جانبی ناشی از درمان های رایج سرطان پستان موجب شده است محققین برای یافتن روش های جایگزین مثل استفاده از فناوری های نانو بیوتکنولوژی،^۸ استفاده از گیاهان دارویی،^۹ استفاده از ویروس هایی موسوم به ویروس های انکولیتیک^{۱۰} یا استفاده از درمان ترکیبی برای درمان سرطان پستان تلاش کنند.^{۱۱} تحقیقات در زمینه ویروس درمانی انکولیتیک چندین دهه ادامه داشته و اخیراً این رویکرد به سطح تحقیقات بالینی رسیده است. ی یکی از نمونه های موفق در این زمینه، T-VEC، ویروس هرپس سیمپلکس انکولیتیک است که سازمان غذا و داروی ایالات متحده آن را برای استفاده بالینی تأیید کرده است. پژوهش ها نشان داده اند که ویروس های انکولیتیک از راهکارهای متنوعی برای هدف گیری سلول های سرطانی استفاده می کنند که این ویژگی آنها را به گزینه ای جذاب در حوزه پزشکی شخصی تبدیل کرده است. در نتیجه، بسیاری از ویروس های انکولیتیک به عنوان عوامل درمانی جدید بالقوه برای درمان سرطان پیشرفته پستان شناسایی شده اند.^{۱۲}

ویروس های انکولیتیک از ویروس های طبیعی مشتق یا مهندسی شده اند که به طور اختصاصی سلول های سرطانی را هدف قرار داده و از بین می برند. روش های جدید مهندسی و اصلاح ژنتیکی نیز در جهت استفاده از استراتژی های هدف گیری رونویسی و ترجمه-ای عمل کرده اند که تکثیر سازه های ناقل انکولیتیک را به سلول های سرطانی محدود می کنند و در نتیجه، از آسیب به سلول های طبیعی جلوگیری می شود.^{۱۳} ویروس های انکولیتیک به طور عمده تومورها را از دو طریق از بین می برند؛ به طور مستقیم با تکثیر و لیز سلول های سرطانی و به طور غیرمستقیم و یا با ایجاد اختلال در مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی که منجر به تشخیص بهتر سلول های سرطانی، تحریک پاسخ های ایمنی، و افزایش حمله ی سیستم ایمنی به تومور می شود.^{۱۴} یکی از ویروس هایی که به عنوان انکولیتیک ویروس استفاده می شود /کو ویروس ها هستند.^{۱۵} /کوویروس ها سروتیپ های متعلق به گونه های آنروویروس انسانی B و خانواده پیکورناویریده هستند. پیکورناویروس ها ویروس هایی کوچک، برهنه و با ژنوم RNA با قطبیت مثبت هستند.^{۱۶} ریگوبر، یک پیکورناویروس انسان سینتوپاتوژن نوع ۷ اصلاح نشده است که برای درمان ملانوم در لتونی از سال ۲۰۰۴، گرجستان از سال ۲۰۱۵ و ارمنستان از سال ۲۰۱۶ تأیید شده است. تصویب آن در سال ۲۰۰۴

یافته‌ها

حجم تومور

همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است تمامی گروه‌های درمانی موجب کاهش معنادار حجم تومور در مقایسه با گروه کنترل گردیدند ($P < 0.05$). بین گروه دریافت کننده /کوویروس و دوکسوربیسین تفاوت معناداری مشاهده گردید ($P < 0.05$) به طوری که میزان اثرگذاری دوکسوربیسین بیشتر از /کوویروس بود ($P < 0.05$). هم چنین نتایج نشان داد که /کوویروس موجب تقویت اثرگذاری دوکسوربیسین در کاهش حجم تومور می‌گردد با اینکه بین گروه دریافت کننده دوکسوربیسین و درمان همزمان تفاوت آماری معناداری دیده نشد ($P > 0.05$).

تحلیل بقا

همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است تمامی گروه‌های درمانی موجب افزایش طول عمر موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل گردیدند ($P < 0.05$). بین گروه دریافت کننده /کوویروس و دوکسوربیسین تفاوت معناداری مشاهده گردید ($P < 0.05$) به طوری که میزان اثرگذاری دوکسوربیسین بیشتر از /کوویروس بود ($P < 0.05$). همچنین، نتایج نشان داد که /کوویروس موجب تقویت اثرگذاری دوکسوربیسین در افزایش طول عمر می‌گردد. بین گروه دریافت کننده دوکسوربیسین و درمان همزمان تفاوت آماری معناداری دیده شد ($P < 0.05$).

سنجش سایتوکاین‌ها

همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، میزان سایتوکاین IFN- γ و سایتوکاین‌های IL-4 و TGF- β (به جز گروه دریافت کننده /کوویروس) و IL-10 به ترتیب در گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه کنترل افزایش و کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0.05$). بین گروه دریافت کننده /کوویروس و دوکسوربیسین در میزان تولید سایتوکاین‌های IFN- γ و IL-10 تفاوت معناداری مشاهده نگردید ($P > 0.05$). همچنین نتایج نشان داد در گروه درمان همزمان /کوویروس موجب تقویت اثرگذاری دوکسوربیسین در تغییرات مذکور در مقایسه با گروه کنترل و دوکسوربیسین می‌گردد.

میزان آزادسازی لاکتات دهیدروژناز و تولید نیتریک اکساید

نتایج بررسی میزان آزادسازی لاکتات دهیدروژناز در نمودار ۴-الف نشان می‌دهد که تمامی گروه‌های درمانی موجب افزایش تولید لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه کنترل شدند. در گروه دریافت کننده همزمان /کوویروس و دوکسوربیسین بالاترین میزان آزادسازی لاکتات دهیدروژناز مشاهده گردید. هرچند بین دو گروه

TGF- β به کمک کیت‌های تجاری زل بيو-آلمان طبق پروتکل شرکت سازنده سنجیده شد.

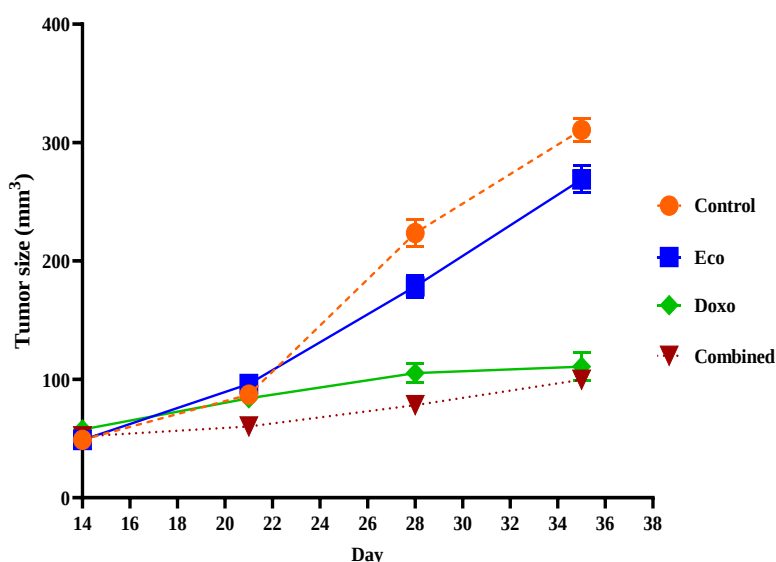
فعالیت سیتوتوکسیک با استفاده از کیت تشخیص سمیت سلولی لاکتات دهیدروژناز ارزیابی شد. این روش یک روش رنگ-سنجی ساده و سریع برای تعیین کمیت سمیت سلولی با تعیین فعالیت لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌های آسیب دیده است. لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم سیتوپلاسمی پایدار است که در اکثر سلول‌ها موجود است و در صورت آسیب سلولی، به صورت آزاد وجود دارد. سلول‌های طحالی به عنوان سلول افکتور و رده سلولی 4T1 به عنوان سلول هدف مورد استفاده قرار گرفتند. سلول افکتور و هدف با محیط کشت (RPMI1640 با ۱ درصد آلبومین سرم گاوی) شسته شدند و به نسبت پنجاه سلول افکتور به یک سلول هدف در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس سانتریفیوژ شده و مایع رویی به پلیت ۹۶ خانه دیگری منتقل شد. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول لاکتات دهیدروژناز به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. OD با استفاده از یک الیزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه گیری شد.^{۱۸}

$$\text{جذب رهايش خودي به خودي افکتور} - \text{جذب رهايش خود به خودي هدف} - \text{جذب ماده تست} = \frac{\text{جذب رهايش خود به خودي} - \text{جذب رهايش پيشينه}}{\text{جذب رهايش خود به خودي}} \times 100$$

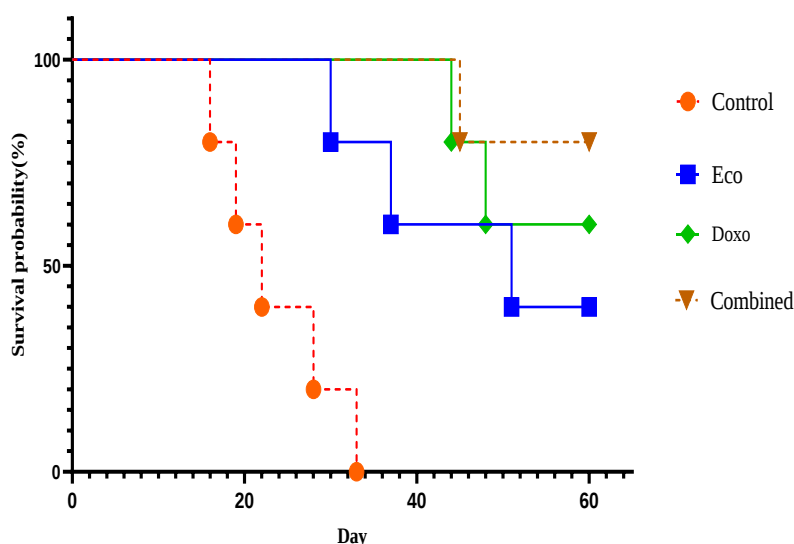
پتانسیل تولید نیتریک اکسید با سنجش سطوح نیتريت مایع رویی سلول‌های طحالی با استفاده از معرف گریس انجام شد. پس از کشت سلول‌های طحالی، مایع رویی بدون سلول (۵۰ میکرولیتر) جمع‌آوری و با ۵۰ میکرولیتر معرف گریس (۱/۰ درصد سولفانیلامید، ۳ درصد اسید فسفریک و ۱/۰ درصد نفتیل-اتیلن دی‌آمین) مخلوط شد و در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی، جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر بر روی دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.^{۱۸} تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Statistics V19) انجام شد. جهت بررسی نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) استفاده گردید. سپس از آزمون‌های کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis H Test) و من-ویتنی (Mann-Whitney U test) برای مقایسه داده‌ها و همچنین به منظور تحلیل بقا موش‌های مورد مطالعه از آزمون کاپلان مایر (Kaplan-Meier) استفاده گردید. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار گراف پد (GraphPad Prism v8) استفاده شد.

دوکسوروبیسین و درمان ترکیبی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). همانطور که در نمودار ۴-ب نشان داده شده است تمامی گروه‌های درمانی موجب افزایش تولید نیتریک اکساید در مقایسه با گروه کنترل گردیدند ($P < 0.05$). بین گروه دریافت‌کننده /کوویروس و دوکسوروبیسین تفاوت معناداری مشاهده گردید ($P < 0.05$). به‌طوری‌که میزان اثرگذاری دوکسوروبیسین بیشتر از /کوویروس بود ($P < 0.05$). همچنین، مطابق با نتایج حاصل، /کوویروس موجب تقویت اثرگذاری دوکسوروبیسین در تولید نیتریک اکساید می‌گردد، با اینکه بین گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و درمان همزمان تفاوت آماری معناداری دیده نشد ($P > 0.05$).

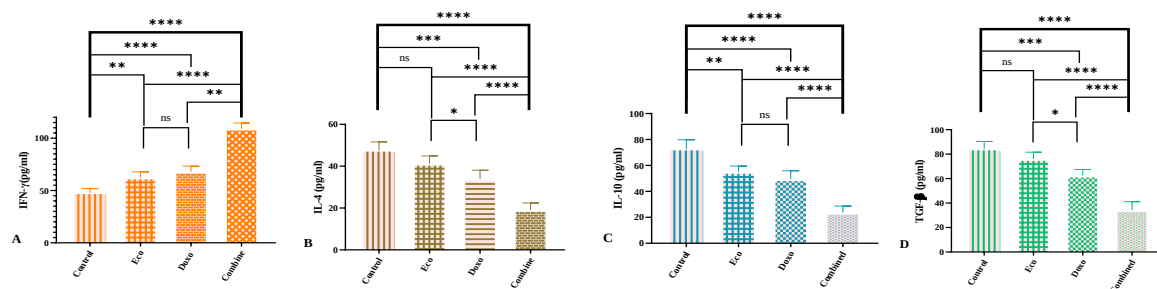
دوکسوروبیسین و درمان ترکیبی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). همانطور که در نمودار ۴-ب نشان داده شده است تمامی گروه‌های درمانی موجب افزایش تولید نیتریک اکساید در مقایسه با گروه کنترل گردیدند ($P < 0.05$). بین گروه دریافت‌کننده /کوویروس و دوکسوروبیسین تفاوت معناداری مشاهده گردید ($P < 0.05$).



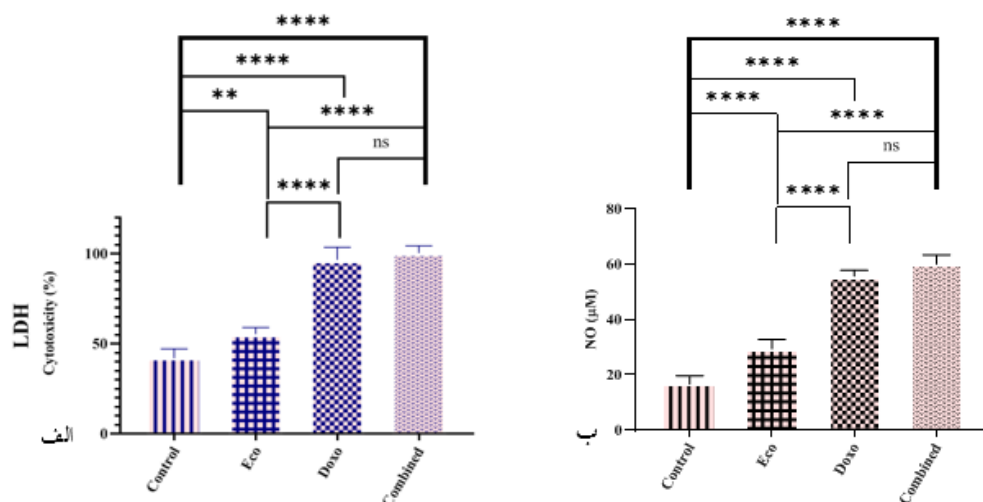
نمودار ۱. تغییرات حجم تومور را در چهار گروه کنترل (دایره‌های نارنجی)، گروه Eco (مربع‌های آبی)، گروه Doxo (لوزی‌های سبز) و گروه Combined (مثلث‌های قرمز) پس از درمان در طول زمان نشان می‌دهد. محور افقی (X) نشان‌دهنده روزهای مختلف پس از شروع درمان و محور عمودی (Y) نشان‌دهنده میانگین حجم تومور به میلی‌متر مکعب (mm^3) است.



نمودار ۲. نمودار بقا (Survival Curve) نشان‌دهنده میزان بقا در چهار گروه مختلف پس از درمان و در طول زمان است. محور افقی (X) نشان‌دهنده زمان (روزها) و محور عمودی (Y) نشان‌دهنده درصد بقا است. چهار گروه مختلف با نمادها و رنگ‌های متفاوت نمایش داده شده‌اند.



نمودار ۳. میزان تولید سایتوکاین‌های IL-4، IL-10، IFN- γ و میزان تولید TGF- β بعد از درمان را در گروه‌های مختلف محور افقی (X: نشان‌دهنده گروه‌های مختلف درمانی) و محور عمودی (Y: نشان‌دهنده مقدار سایتوکاین بر اساس پیکوگرم بر میلی‌لیتر) نشان می‌دهد. * معنی‌داری در سطح $P < 0.05$; ** معنی‌داری در سطح $P < 0.01$; *** معنی‌داری در سطح $P < 0.001$; **** معنی‌داری در سطح $P < 0.0001$.



نمودار ۴. محور عمودی میزان آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز و نیتریک اکساید و محور افقی گروه‌های مختلف کنترل (بدون درمان)، درمان با/کوئیروس، درمان با دوکسوروبیسین و درمان ترکیبی/کوئیروس و دوکسوروبیسین را نشان می‌دهد (* معنی‌داری در سطح $P < 0.05$; ** معنی‌داری در سطح $P < 0.01$; *** معنی‌داری در سطح $P < 0.001$; **** معنی‌داری در سطح $P < 0.0001$).

بحث

دوکسوروبیسین به همراه/کوئیروس (درمان ترکیبی) در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده تک‌عاملی و کنترل کاهش معناداری را نشان داد. همچنین، میزان بقا، سطح تولید سایتوکاین IFN- γ ، تولید نیتریک اکساید و لاکتات دهیدروژناز در گروه درمان ترکیبی افزایش معناداری نسبت به سایر گروه‌های درمانی و کنترل داشت. سیتوکین‌ها نقش مهمی در کنترل پاسخ سیستم ایمنی به سرطان و تعیین سیر بیماری دارند. سایتوکاین‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی که از بقای سلول‌های سرطانی حمایت می‌کنند و تکثیر سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهند، بر ریزمحیط تومور تسلط دارند و باعث رشد تومور می‌شوند. سیتوکین‌های سرکوب‌کننده و

با توجه به عوارض جانبی بالای داروهای شیمی‌درمانی و انتخابی و هدفمند عمل نکردن آنها، محققین به دنبال یافتن روش‌های نوین در درمان سرطان پستان هستند که هم عوارض کمتری داشته باشد و هم مؤثرتر از روش‌های رایج باشد. یکی از این روش‌ها استفاده از مکمل‌های درمانی از جمله ویروس‌های انکولیتیک به همراه داروی های شیمی درمانی به صورت درمان ترکیبی می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات ضد توموری/کوئیروس به همراه دوکسوروبیسین در مدل موشی سرطان پستان بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حجم تومور، سطح تولید سایتوکاین‌های IL-4، IL-10 و TGF- β در موش‌های دریافت‌کننده عوامل

پیشرفت، متاستاز و توسعه سرطان پستان ایفا می‌کند.^{۳۹} نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان با/کوویروس موجب کاهش IL-4 و IL-10 می‌شود. یافته‌های این مطالعه با نتایج پژوهش‌های دیگر که نشان می‌دهند با کاهش بیشتر IL-4 و IL-10 حجم تومورها نیز کاهش می‌یابد، مطابقت دارد. نیتریک اکسید یک مولکول سیگنال‌دهی رادیکال آزاد است که بسیاری از فرایندهای سلولی از جمله رگ‌زایی، پاسخ ایمنی، آپوپتوز و ارتباطات سیناپسی را تنظیم می‌کند. علاوه بر بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی نیتریک اکساید، در آسیب‌شناسی و پیشرفت بسیاری از فرایندهای بیماری از جمله سرطان نقش دارد.^{۴۰} جعفری و همکاران گزارش کردند که افزایش نیتریک اکساید موجب کاهش حجم تومور و افزایش بقا در موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌گردد.^{۴۱} نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که پس از درمان با دوکسوروبیسین تولید نیتریک اکساید افزایش می‌یابد و تولید آن رابطه معکوسی با حجم تومور دارد. همچنین مطابق با یافته‌ها، درمان با/کوویروس موجب افزایش تولید نیتریک اکساید و کاهش حجم تومور می‌شود که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. بررسی اثرات درمان‌های مذکور در دراز مدت و همچنین استفاده از غلظت‌های مختلف داروی دوکسوروبیسین به همراه/کوویروس از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر بود که در مطالعات آتی به آن پرداخته خواهد شد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که/کوویروس به‌عنوان یک مکمل و تقویت‌کننده عملکرد دوکسوروبیسین می‌تواند موجب کاهش حجم تومور، افزایش بقا، تولید نیتریک اکساید، لاکتات دهیدروژناز، افزایش سطح سایتوکاین IFN- γ و کاهش سطح تولید سایتوکاین‌های ضدالتهابی IL-4، IL-10 و TGF- β در مدل موشی سرطان پستان شود. همچنین، استفاده همزمان دوکسوروبیسین و/کوویروس اثربخشی بیشتری در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده تک دارویی دارد و به‌عنوان یک راهکار درمانی نوین پیشنهاد می‌شود.

قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایانامه مقطع دکتری خانم فاطمه امینیان با کد اخلاق IR.BPUMS.REC.1402.048 می‌باشد. نویسندگان مقاله سپاس و قدردانی خود را از تمام افرادی که در پیشبرد این پژوهش یاری رساندند، اعلام می‌دارند.

ضد التهابی سیستم ایمنی IL-4، TGF- β و IL-10 معمولاً در اکثر فرم‌های تومور یافت می‌شوند و باعث رشد و گسترش تومور می‌گردند.^{۴۲} تومورها می‌توانند با ترشح واسطه‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی مانند IL-4، TGF- β و IL-10 از سیستم ایمنی فرار کنند، که می‌تواند اجزای مهم سیستم ایمنی ضدتومور، مانند ماکروفاژهای التهابی و همچنین پاسخ‌های Th1 را کاهش دهد.^{۴۱} IL-4 رشد تومور را تحریک می‌کند، درحالی‌که TGF- β و IL-10، ایمنی در برابر تومورها را کاهش می‌دهند. IL-4 می‌تواند به‌طور مستقیم رشد سلول‌های تومور را تحریک کند، اما TGF- β و IL-10 به‌طور غیرمستقیم باعث رشد تومور از طریق کاهش ایمنی سلولی می‌شوند و این امر رشد تومور را سرکوب می‌کند.^{۴۲} از سوی دیگر، هر دو نوع سیتوکین می‌توانند پاسخ سلول‌های T به تومورها را سرکوب کرده و رشد سلول‌های T تنظیمی را تحریک کنند. با کمال تعجب، سلول‌های T تنظیمی نیز TGF- β و IL-10 تولید می‌کنند.^{۴۳} IFN- γ برای فعال کردن ایمنی سلولی ضروری است، که به نوبه خود پاسخ ایمنی ضدتومور را تحریک می‌کند. علاوه بر این، IFN- γ ممکن است از رگ‌زایی تومور جلوگیری کند، مرگ سلولی تنظیمی را آغاز کند، و/یا فعالیت ماکروفاژهای پیش التهابی M1 را برای توقف رشد تومور افزایش دهد.^{۴۴} فعال شدن سیستم ایمنی راهی برای بافت میزبان برای دفاع از خود در برابر رشد تومور است. از این رو، استراتژی‌های درمانی مبتنی بر تعدیل ایمنی در حال افزایش است. داروهای سیتواستاتیک معمولی مانند دوکسوروبیسین موجب افزایش IFN- γ می‌شود.^{۴۵} سمیت سلولی دوکسوروبیسین را می‌توان در ترکیب با/کوویروس که موجب افزایش سایتوکین IFN- γ می‌شود افزایش داد. IL-4 روی لنفوسیت‌های B، مونوسیت‌ها، سلول‌های دندریتیک و فیبروبلاست‌ها عمل می‌کند و پاسخ‌های آلرژیک را تعیین می‌کند. ثابت شده است که IL-4 هم اثرات ضد توموری و هم ضدالتهابی دارد.^{۴۶} نقش IL-4 در پاتوژنز توسعه سرطان پستان و مقاومت به آپوپتوز و متاستاز موضعی در چندین مطالعه گزارش شده است.^{۴۷} گاجیانسی و همکاران تأثیر مسدودکردن IL-4 با آنتاگونیست IL4DM IL4Ra را در تومورهای غدد پستانی مورد مطالعه قرار داده و مهار تکثیر، تهاجم و رشد سلول‌های سرطانی را که با کاهش فعالیت مسیر پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن به دست آمده بود، گزارش کردند.^{۴۸} IL-10 به‌طور کلی بهترین و شناخته‌شده‌ترین سایتوکین ضد التهابی می‌باشد. بسیاری از مطالعات نقش IL-10 را در سرطان پستان با آشکارکردن بیان mRNA بالای IL-10 سلول‌های تومور پستان گزارش کرده‌اند. علاوه بر این، نقش چندمنظوره آن، از جمله عملکردهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و ضد رگ‌زایی، ثابت شده است که نقش‌های مختلفی در پاتوژنز،

مشارکت پدیدآوران

فاطمه امینیان: انجام کارهای آزمایشگاهی؛ هادی اسمعیلی گورچین قلعه و ناهید بابایی: راهبری و ایده پردازی؛ غلامرضا خمیسی پور و مهدیه فرزانه پور: نگارش و تفسیر داده ها را برعهده داشتند. تمامی نویسندگان متن مقاله را مطالعه و تأیید نمودند.

دسترس پذیری داده ها

داده های ایجاد شده در مطالعه فعلی در دسترس عموم نیست، اما در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه خواهد شد.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع مالی

نویسندگان اظهار می دارند هیچ منبع مالی از هیچ موسسه ای دریافت نکرده اند.

References

- Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine*. 2024;103(3):e36905. doi: 10.1097/MD.00000000000036905.
- Adanu KK, Bansah EC, Adedia D, Aikins M. Household treatment cost of breast cancer and cost coping strategies from a tertiary facility in Ghana. *PLOS Global Public Health*. 2022;2(3):e0000268. doi: 10.1371/journal.pgph.0000268.
- Jalali FS, Keshavarz K, Seif M, Akrami M, Jafari A, Ravangard R. Economic burden of breast cancer: a case of Southern Iran. *Cost Effectiveness and Resource Allocation*. 2023;21(1):58. doi: 10.1186/s12962-023-00478-0.
- Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of breast cancer therapy. *PET clinics*. 2018;13(3):339-54. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006.
- Taymaz-Nikerel H, Karabekmez ME, Eraslan S, Kırdar B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Scientific reports*. 2018;8(1):13672. doi: 10.1038/s41598-018-31939-9.
- Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC cancer*. 2018;18:1-11. doi: 10.1186/s12885-017-3953-6.
- Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*. 2023;12(4):659. doi:10.3390/cells12040659.
- Chehelgerdi M, Chehelgerdi M, Allela OQ, Pecho RD, Jayasankar N, Rao DP, et al. Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. *Molecular cancer*. 2023;22(1):169. doi: 10.1186/s12943-023-01865-0.
- Aryan H. The role of herbal medicine as anti-cancer medicine: From the claim to truth. *Galen Medical Journal*. 2018;7:e1179. doi: 10.22086/gmj.v0i0.1179.
- Zolaly MA, Mahallawi W, Khawaji ZY, Alahmadi MA. The clinical advances of oncolytic viruses in cancer immunotherapy. *Cureus*. 2023;15(6):e40742. doi: 10.7759/cureus.40742.
- Fisusi FA, Akala EO. Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*. 2019;7(1):3-23. doi: 10.2174/2211738507666190122111224.
- Gao P, Ding G, Wang L. The efficacy and safety of oncolytic viruses in the treatment of intermediate to advanced solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Translational Cancer Research*. 2021;10(10):4290. doi: 10.21037/tcr-21-905.
- O'Bryan SM, Mathis JM. Oncolytic virotherapy for breast cancer treatment. *Current Gene Therapy*. 2018;18(4):192-205. doi: 10.2174/1566523218666180910163805.
- Ma R, Li Z, Chiocci EA, Caligiuri MA, Yu J. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy. *Trends in cancer*. 2023;9(2):122-39. doi: 10.1016/j.trecan.2022.10.003.
- Hietanen E, Koivu MK, Susi P. Cytolytic properties and genome analysis of Rigvir® oncolytic virotherapy virus and other Echovirus 7 isolates. *Viruses*. 2022;14(3):525. doi: 10.3390/v14030525.
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Viruses with single-stranded, positive-sense RNA genomes. *Molecular virology*. 2013 Aug 12;185. doi: 10.1007/978-3-642-20718-1_14.
- Tilgase A, Patetko L, Bläke I, Ramata-Stunda A, Borodušakis M, Alberts P. Effect of the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir® on the viability of cell lines of human origin in vitro. *Journal of Cancer*. 2018;9(6):1033. doi: 10.7150/jca.23242.
- Jafari S, Froushani SM, Tokmachi A. Combined extract of heated 4T1 and a heat-killed preparation of *Lactobacillus casei* in a mouse model of breast cancer.

- Iranian Journal of Medical Sciences. 2017;42(5):457-64.
19. Gao ZG, Tian L, Hu J, Park IS, Bae YH. Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles. *Journal of controlled release*. 2011;152(1):84-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.01.021.
 20. Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE open medicine*. 2022;10:20503121211069012. doi: 10.1177/20503121211069012.
 21. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):263. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
 22. Chen Y, Liu H, Sun Y. Effect of acute inflammatory reaction induced by biopsy on tumor microenvironment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2024;150(4):177. doi: 10.1007/s00432-024-05704-7.
 23. Zhang Y, Guan XY, Jiang P. Cytokine and chemokine signals of T-cell exclusion in tumors. *Frontiers in immunology*. 2020;11:594609. doi: 10.3389/fimmu.2020.594609.
 24. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker research*. 2020;8:1-6. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x.
 25. Mukherjee O, Rakshit S, Shanmugam G, Sarkar K. Role of chemotherapeutic drugs in immunomodulation of cancer. *Current Research in Immunology*. 2023;4:100068. doi: 10.1016/j.crimmu.2023.100068.
 26. Keegan AD, Leonard WJ, Zhu J. Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling. *Fac Rev*. 2021;10:71. doi: 10.12703/r/10-71.
 27. Zacharias F, Kolios G, Valentinos P, Kontomanolis EN. Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus*. 2018;10(11):e3549. doi: 10.7759/cureus.3549.
 28. Gaggianesi M, Turdo A, Chinnici A, Lipari E, Apuzzo T, Benfante A, et al. IL4 primes the dynamics of breast cancer progression via DUSP4 inhibition. *Cancer research*. 2017;77(12):3268-79. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3126.
 29. Sheikhpour E, Noorbakhsh P, Foroughi E, Farahnak S, Nasiri R, Neamatzadeh H. A survey on the role of interleukin-10 in breast cancer: A narrative. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2018;7(1):30.-7.
 30. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiological reviews*. 2019;99(1):311-79. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.