Journal of Military Medicine
2024, Volume 26, Issue 4
Pages: 2420-2429
10.30491/jmm.2024.1006722.1215

Increasing the Anticancer Potential of Newcastle Diseases Virus with Electrical Pulses in Lung Cancer Cell Line

Majid Mirzaei Nodooshan [1], Zeinab Shankayi [2,3], Mahdieh Farzanehpour [1], Ruhollah Dorostkar [1], Hadi Esmaeili Gouvarchin Ghaleh [1*]

[1] *Applied Virology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Department of Physiology and Medical Physics, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 4 August 2024 **Accepted:** 10 September 2024

Abstract

Background and Aim: Despite the advancements made in various fields of lung cancer treatment, surgery is still recognized as the most effective method for treating this type of cancer, often in conjunction with radiotherapy, with or without chemotherapy. Drug resistance, side effects, and the lack of selectivity of these methods have led researchers to continually seek novel and targeted approaches for lung cancer treatment. Among these innovative methods is the use of oncolytic viruses. Various studies have shown that the Newcastle disease virus (NDV) has oncolytic activity, as it selectively replicates in tumor cells due to their inadequate antiviral response. The aim of the present study is to enhance the anticancer potential of the NDV using electrical pulses (EP) in lung cancer cell lines.

Methods: In this study, after culturing A549 cells, the effective dose of the NDV was determined. Then, the levels of cell viability, apoptosis percent, production of reactive oxygen species (ROS), and lactate dehydrogenase (LDH) release were measured in cancer groups treated with the NDV, with or without EP.

Results: The results of the present study showed that the apoptosis rate (69.00 ± 7.54%), production of ROS (2.08 ± 0.037-fold change), and LDH (73.87 ± 2.07%) in the group treated with the NDV along with EP increased compared to other treatment groups and the control group, while cell viability (45.80 ± 2.70%) significantly decreased.

Conclusion: Based on the results of the current study, it appears that EP lead to an increase in the anticancer potential of the NDV in lung cancer cell lines.

Keywords: Lung Cancer, Oncolytic Virus, Newcastle Diseases Virus, Electrical Pulses.

*Corresponding author: **Hadi Esmaeili Gouvarchin Ghaleh,** Email: h.smaili69@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۶، شماره ۴، مهر و آبان ۱۴۰۳
صفحات: ۲۴۲۹-۲۴۲۰
10.30491/jmm.2024.1006722.1215

افزایش پتانسیل ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی در رده سلولی سرطان ریه

مجید میرزائی ندوشن[۱]، زینب شنکایی[۲،۳]، مهدیه فرزانه‌پور[۱]، روح الله درستکار[۱]، هادی اسمعیلی گورچین قلعه[۱*]

[۱] مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، پژوهشکده فناوری‌های زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۳] گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با وجود پیشرفت‌های حاصل شده در حوزه‌های مختلف درمان سرطان ریه، جراحی همچنان به عنوان موثرترین روش درمان این نوع سرطان به همراه رادیوتراپی، با یا بدون شیمی درمانی شناخته می‌شود. مقاومت‌های دارویی، عوارض و انتخابی عمل نکردن روش‌های مذکور باعث شده است که محققان همواره دنبال روش‌های نوین و هدفمند درمان سرطان ریه باشند. از جمله روش‌های نوین درمان سرطان استفاده از ویروس‌های انکولیتیک می‌باشد. مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) دارای فعالیت انکولیتیک بوده که در سلول‌های توموری به دلیل عدم پاسخ مناسب ضد ویروسی آن‌ها تکثیر انتخابی دارد. هدف از مطالعه حاضر افزایش پتانسیل ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی (EP) در رده سلولی سرطان ریه می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه بعد از کشت سلول‌های A549، IC_{50} ویروس بیماری نیوکاسل تعیین گردید. سپس میزان سمیت، زنده مانی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز در گروه‌های سرطانی تحت تیمار با ویروس بیماری نیوکاسل با یا بدون پالس‌های الکتریکی سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد آپوپتوز (۷/۵۴ ± ۶۹٪)، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (۰/۰۳۷ ± ۲/۰۸ برابری) و آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز (۲/۰۷ ± ۷۳/۸۷٪) در گروه تحت تیمار با ویروس بیماری نیوکاسل به همراه پالس‌های الکتریکی نسبت به سایر گروه‌های درمانی و گروه کنترل افزایش و همچنین میزان زنده مانی (۲/۷۰ ± ۴۵/۸۰٪) کاهش معناداری یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد پالس‌های الکتریکی موجب افزایش پتانسیل ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل در رده سلولی سرطان ریه می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: سرطان ریه، ویروس انکولیتیک، ویروس بیماری نیوکاسل، پالس الکتریکی.

*نویسنده مسئول: **هادی اسمعیلی گورچین قلعه.** پست الکترونیک: h.smaili69@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۶/۲۰

مقدمه

سرطان، یکی از عوامل اصلی مرگ در جوامع توسعه یافته و کمتر توسعه یافته است. با روند رو به رشد افزایش سالمندان در کشورهای کمتر توسعه یافته، افزایش مرگ و میر ناشی از سرطان، به ویژه سرطان ریه که به عنوان یکی از مرگبارترین انواع سرطان‌ها شناخته شده است، مورد انتظار است. این نوع سرطان را می‌توان بر اساس اندازه سلول‌های بدخیم به دو گروه تقسیم کرد: سلول‌های کوچک (۱۵ درصد) و سلول‌های غیرکوچک (۸۵ درصد) (۱). درمان سرطان ریه معمولاً با چالش‌هایی روبرو است زیرا این بیماری حین تشخیص به مراحل پیشرفته‌تری می‌رسد. روش‌های درمان سرطان ریه شامل جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، درمان هدفمند مولکولی و درمان‌های همترازی مانند درمان‌های کمکی و پالیاتیو (تسکینی) می‌باشد (۲). مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند در بیمارانی که تومور به طور کامل قابل برداشت باشد و بیمار تحمل عمل جراحی را داشته باشد روش جراحی موثر واقع خواهد شد. یکی از دلایل اصلی که موجب عدم موفقیت درمان‌های سرطان ریه می‌شود، تشخیص دیرهنگام این بیماری و در مراحل پیشرفته‌تر آن است که موجب کاهش اثر درمان‌ها می‌شود. همچنین، مقاومت به درمان‌های شیمی درمانی و دیگر روش‌های درمانی نیز می‌تواند باعث عدم موفقیت درمانی گردد (۳). عوامل دیگری نیز می‌توانند سبب شوند که درمان موفقیت آمیز نباشد؛ مانند وجود بیماری‌های همزمان، عدم اطلاعات کافی در مورد سرطان و تأخیر در تشخیص. درمان‌های سرطان ریه معمولا با عوارض مختلفی همراه هستند. برخی از عوارض شایع شامل خستگی، سردرد، تهوع و استفراغ، کاهش اشتها، تغییر در طعم غذا، مشکلات گوارشی، افت انرژی، تغییرات در پوست و مو، ضعف عمومی، عفونت‌های مزمن و خونریزی می‌باشند (۴). با توجه به موارد مذکور ابداع راهکارهای درمانی جدید و بدون عوارض جانبی، ضروری به نظر می‌رسد. یکی از روش‌های درمانی جدید استفاده از ویروس‌های انکولیتیک در درمان سرطان می‌باشد. این روش در دهه‌های اخیر بیش از پیش مورد توجه محققان واقع شده است و نتایج مطالعات در درمان برخی از انواع سرطان‌ها موفقیت‌آمیز گزارش شده است (۵). اصطلاح "ویروس‌های انکولیتیک" یا "ویروس‌های لیزکننده سرطان" برای ویروس‌هایی به کار می‌رود که به طور خاص و انتخابی درون سلول‌های سرطانی تکثیر نموده و آن‌ها را تخریب می‌نمایند و سمیت کمتری علیه سلول‌های طبیعی دارند (۶). ویروس‌ها ممکن است این توانایی را به صورت وراثتی داشته باشند یا به واسطه مهندسی ژنتیک در آن‌ها ایجاد شود. معرفی ویروس‌های انکولیتیک راهکارهای جدیدی برای کاهش و درمان تومورهای بدخیم ارائه می‌دهد. مطالعات بالینی مزایای استفاده از ویروس‌های انکولیتیک برای بیماران مبتلا به انواع مختلف تومور، در مراحل مختلف بیماری، از جمله تومورهای بدخیم و غیرقابل درمان را نشان داده است (۷). ویروس بیماری نیوکاسل به طور قابل توجهی در مرغداری‌ها اثر مرگباری دارد که منجر به طراحی و تولید واکسن از ویروس ضعیف شده برای مرغ‌ها شده است. همچنین ویژگی‌های انکولیتیک ویروس بیماری نیوکاسل نیز استفاده از آن به عنوان یک عامل ضد سرطانی را تسهیل کرده است. ویروس بیماری نیوکاسل به طور انتخابی درون سلول‌های توموری سبب شکل‌گیری عفونت و تکثیر می‌شود (۸). ورود اصلی آن به سلول‌ها از طریق تعامل بین گلیکوپروتئین‌ها و گیرنده‌های سلولی و هماگلوتینین نورامینیداز آن است که انتخابی بودن این تعامل‌ها ورود ویروس به سلول‌ها را تعیین می‌کند. متفاوت بودن سطح بیان و پراکنندگی گیرنده‌های ویروس بیماری نیوکاسل در سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های سالم، باعث ایجاد اتصال انتخابی می‌شود. ویروس بیماری نیوکاسل به طور گسترده از نظر انتخاب و تمایل به بافت و سلول توموری در مقایسه با سلول طبیعی، کارایی و بی خطری مورد مطالعه قرار گرفته است و قادر به عفونت و از بین بردن انواع مختلف سلول‌های سرطانی است (۹). در سلول‌های توموری، ویروس بیماری نیوکاسل نسبت به سلول‌های سالم به طور قابل توجهی بیشتر تکثیر می‌کند، عوامل ضد تومور را فعال می‌کند و عملکرد سلول‌های ایمنی را بهبود می‌بخشد. این ویروس در سلول‌های سرطانی آپوپتوز ایجاد کرده و منجر به افزایش آزادسازی سایتوکاین‌ها و جذب سلول‌های ایمنی به محیط توموری می‌شود (۱۰). یکی از معایب استفاده از ویروس‌های انکولیتیک نفوذپذیری پایین برخی سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱۱). در سال ۱۹۷۲ نیومن و همکارانش برای اولین بار، توانایی پالس‌های الکتریکی در افزایش نفوذپذیری سلول را گزارش کردند. این پالس‌ها در غشا سلول، کانال‌های الکتریکی‌ای ایجاد می‌کنند که سبب تسهیل ورود ماکرومولکول‌ها، یون‌ها و ... می‌شوند. روش الکتروکموتراپی که درمانی ترکیبی با استفاده از پالس‌های الکتریکی و تزریق داروهای شیمیایی است، به عنوان روشی نوین در درمان تومورهای سطحی و جامد قابل دستیابی است (۱۲). در روش الکتروکموتراپی استاندارد و کلینیکی ۸ پالس با پهنای ۱۰۰ میکروثانیه، فرکانس ۱ هرتز و شدت میدان ۱۰۰۰ الی ۱۳۰۰ ولت بر سانتیمتر، پس از تزریق داروی شیمی درمانی، به مدت چند دقیقه و به صورت موضعی بر تومور اعمال می‌شود که باعث افزایش نفوذ دارو شده و بازده درمان را به طور چشمگیری بهبود می‌بخشد (۱۳،۱۴). این روش نوین در کنار مزایای خود معایبی را نیز به همراه دارد که ایجاد سوختگی در بافت درمان شده و انقباض عضلانی در پی اعمال پالس‌های الکتریکی و در نتیجه القا حس ناخوشایند در بیماران تحت درمان، از جمله آن‌ها هستند. عامل این دو مشکل، شدت میدان الکتریکی بالا و فرکانس پایین پالس‌های اعمالی است (۱۵). بنابراین دو راهکار استفاده از پالس‌هایی با شدت پایین و فرکانس بالا، برای افزایش نفوذپذیری داروهای شیمی درمانی توسط محققین پیشنهاد شده است (۱۲). هدف از مطالعه حاضر افزایش پتانسیل ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی در رده سلولی سرطان ریه می‌باشد.

روش‌ها

طراحی مطالعه

رده سلولی سرطان ریه انسان A549 (موسسه پاستور- ایران) در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) با ۱۰٪ FBS (Bio-idea, Iran) و ۱٪ پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شدند. شرایط بهینه برای رشد سلولی در انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۸٪ و غلظت ۵٪ CO_2 تنظیم شد. به طور خلاصه طبق مطالعه اسمعیلی و همکاران (۲۰۲۴) (۱۶) جهت تعیین غلظت IC_{50} ویروس بیماری نیوکاسل، سلول‌های A549 با ضریب آلودگی‌های مختلف از ویروس (۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. به منظور تعیین افزایش نفوذپذیری احتمالی ویروس به کمک پالس‌های الکتریکی، سلول‌های سرطانی با IC_{50} ویروس بیماری نیوکاسل با (NDV+EP) یا بدون پالس‌های الکتریکی (EP) تیمار شدند. از یک ژنراتور موج مربعی (پارس زیست الکترو مغناطیس) برای تولید یک پالس الکتریکی با ولتاژ ۴۰۰ ولت در مدت زمان ۲ میلی‌ثانیه داخل کووت الکتروپوریشن ۴ میلی‌متری استفاده شد.

تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌های A549

زنده‌مانی سلول‌ها از طریق روش رنگ‌سنجی که در آن احیاء ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازان می‌گردد، انجام شد. بعد از کشت سلول‌های A549 در پلیت ۹۶ خانه، اقدام به تیمار آن‌ها با ویروس بیماری نیوکاسل با یا بدون پالس‌های الکتریکی به مدت ۴۸ ساعت گردید. سپس محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت کریستال‌های فورمازان تشکیل شده در ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. میزان جذب نوری چاهک‌ها به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درصد زنده‌مانی سلول با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد (۱۷):

$$\text{درصد زنده مانی سلول} = \frac{\text{میزان جذب نوری سلولهای تیمار شده در ۵۷۰ نانومتر}}{\text{میزان جذب نوری سلولهای بدون تیمار در ۵۷۰ نانومتر}} \times ۱۰۰$$

تعیین میزان آپوپتوز

به منظور تعیین میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (AO) و اتیدیوم بروماید (EtBr) طبق مطالعه دودانگه و همکاران (۲۰۲۳) استفاده شد. بعد از کشت سلول‌های A549 در پلیت ۲۴ خانه، اقدام به تیمار آن‌ها با ویروس بیماری نیوکاسل با یا بدون پالس‌های الکتریکی به مدت ۴۸ ساعت گردید. سپس چاهک‌ها به آرامی دو بار با PBS شسته شدند. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول AO/EtBr (5 µg/ml AO و 5 µg/ml EB در PBS) به تمامی چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۲ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مایع رویی خارج شد و آپوپتوز سلولی در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد (۱۷).

تعیین میزان آزادسازی لاکتات دهیدروژناز (LDH)

LDH آنزیمی است که لاکتات را به پیروات تبدیل می‌کند و به طور فراوان در سیتوزل وجود دارد. در صورت آسیب سلولی و از بین رفتن یکپارچگی غشای پلاسمایی لاکتات دهیدروژناز به محیط کشت سلول آزاد شده و سطح خارج سلولی آن افزایش می‌یابد. برای سنجش آزادسازی LDH، محلول رویی سلول‌های بدون تیمار و تیمار شده جمع‌آوری شد و طبق مطالعه قدک ساز و همکاران و دستورالعمل کیت تجاری (کیازیست، همدان) با محلول‌های موجود در کیت مخلوط و انکوبه شد و میزان جذب نوری به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و طبق فرمول کیت محاسبه شد (۱۸).

تعیین میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)

برای سنجش میزان تولید ROS درون سلولی، بعد از کشت سلول‌های A549 در پلیت ۲۴ خانه، اقدام به تیمار آن‌ها با ویروس بیماری نیوکاسل با یا بدون پالس‌های الکتریکی به مدت ۴۸ ساعت گردید. سپس محیط رویی خارج و طبق دستورالعمل سازنده (کیازیست، همدان ایران) اندازه‌گیری شد و در نهایت، فلورسانس با تحریک و انتشار در Ex/Em = ۴۸۵/۵۲۸ نانومتر با استفاده از یک میکروپلیت- فلوریمتری ارزیابی شد (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ آنالیز شدند. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تست استفاده شد. در تمامی ارزیابی‌ها $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

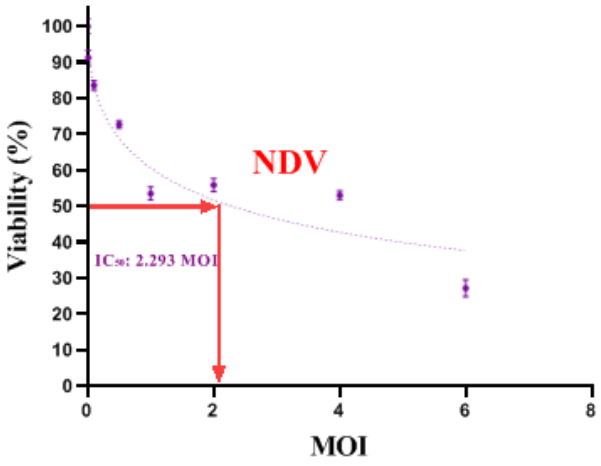
نتایج

غلظت IC_{50}

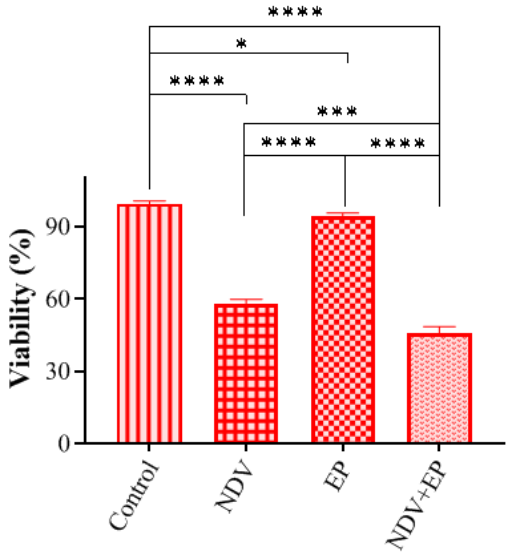
همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است بعد از تیمار سلول‌های سرطانی ریه با ضریب آلودگی‌های (MOIs) مختلف ویروس بیماری نیوکاسل به مدت ۴۸ ساعت، ضریب آلودگی ۲/۲۹۳ به عنوان غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (IC_{50}) تعیین گردید.

زنده‌مانی

نتایج زنده‌مانی نشان داد که تمامی گروه‌های مطالعه موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل گردیده‌اند. میزان کاهش زنده‌مانی در گروه NDV در مقایسه با گروه EP بیشتر می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که استفاده



نمودار-۱. غلظت مهار کننده نیمی حداکثر (IC_{50}) ویروس بیماری نیوکاسل بر روی سلول‌های سرطان ریه.



نمودار-۲. میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی ریه بعد از تیمار در گروه‌های مختلف مطالعه (* نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۵$)، ** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۱$)، *** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۱$) و **** نشان دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۰۱$)). (ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی (NDV+EP) یا بدون پالس‌های الکتریکی (EP)).

همزمان از پالس‌های الکتریکی (EP) موجب افزایش میزان اثرگذاری NDV در مقایسه با گروه کنترل و گروه NDV می‌گردد (نمودار ۲).

آپوپتوز

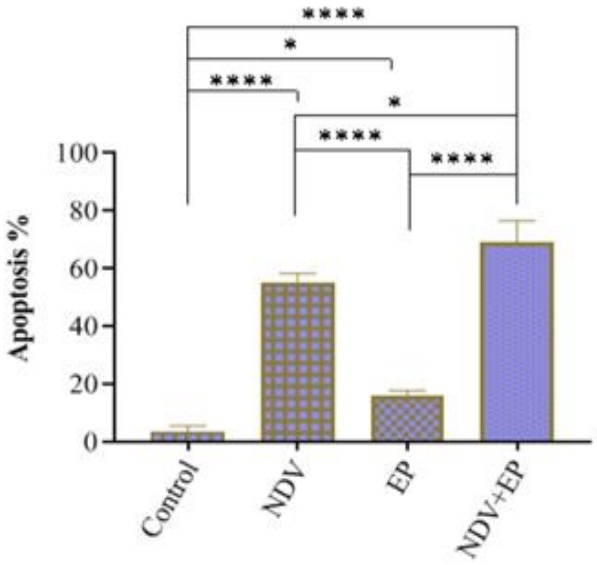
به منظور بررسی درصد آپوپتوز از رنگ آمیزی فلورسنت استفاده گردید به طوری که سلول‌های سبز رنگ به منزله سلول‌های سالم و سلول‌های نارنجی/ قرمز رنگ به منزله سلول‌های آسیب دیده بود. همانطور که در نمودار ۳ نشان داده شده است تمامی گروه‌های مطالعه موجب افزایش درصد آپوپتوز سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل گردیده‌اند. درصد آپوپتوز در گروه NDV در مقایسه با گروه EP بیشتر می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که استفاده همزمان از EP موجب افزایش میزان اثرگذاری NDV در مقایسه با گروه کنترل و گروه NDV می‌گردد. بیشترین میزان آپوپتوز در گروه درمان همزمان قابل مشاهده است.

آزاد سازی LDH

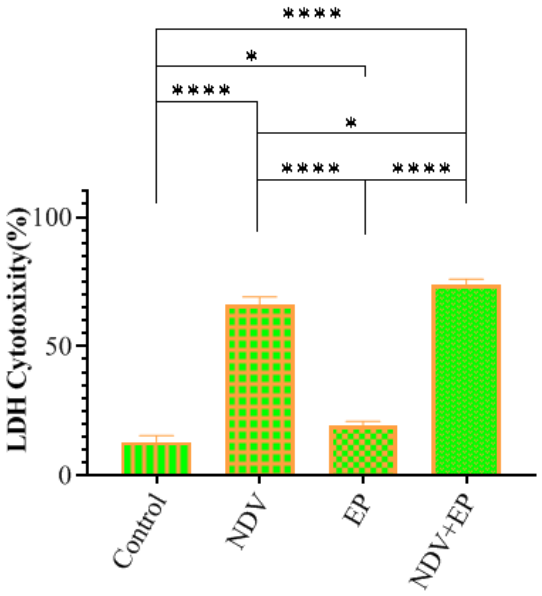
تمامی گروه‌های مطالعه موجب افزایش آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز از سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل گردیدند. درصد آزادسازی لاکتات دهیدروژناز در گروه NDV در مقایسه با گروه EP بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد که استفاده همزمان از EP موجب افزایش میزان اثرگذاری NDV در مقایسه با گروه کنترل و گروه NDV می‌گردد. بیشترین میزان آزادسازی LDH در گروه درمان همزمان قابل مشاهده است.

تولید ROS

نتایج نشان داد که میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در تمامی گروه‌های مطالعه در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری



نمودار-۳. میزان آپوپتوز سلول‌های سرطانی ریه بعد از تیمار در گروه‌های مختلف مطالعه. سلول‌های سبز رنگ و نارنجی رنگ به ترتیب مشخصه سلول‌های سالم و آپوپتوزی می‌باشد (* نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۵$)، ** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۱$)، *** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۱$) و **** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۰۱$)). (ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی (NDV+EP) یا بدون پالس‌های الکتریکی (EP)).

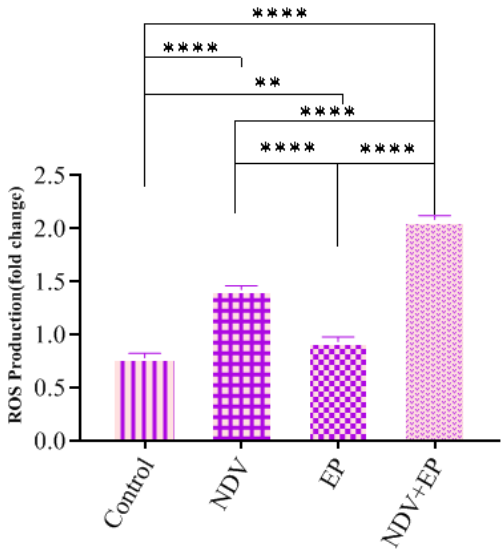


نمودار-۴. میزان آزادسازی لاکتات دهیدروژناز از سلول‌های سرطانی ریه بعد از تیمار در گروه‌های مختلف مطالعه (* نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۵$)، ** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۱$)، *** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۱$) و **** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۰۱$)). (ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی (NDV+EP) یا بدون پالس‌های الکتریکی (EP))

داشته است. میزان تولید در گروه NDV در مقایسه با گروه EP بیشتر می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که استفاده همزمان از EP موجب افزایش میزان اثرگذاری NDV در مقایسه با گروه کنترل و گروه NDV می‌گردد. بیشترین میزان تولید ROS در گروه درمان همزمان قابل مشاهده است.

بحث

سرطان یکی از بزرگترین مشکلات سلامتی جوامع امروزی است. در سلول‌های سرطانی، DNA دچار آسیب می‌شود و در ادامه، این آسیب ترمیم نمی‌شود و منجر به تولید سلول‌های جدیدی می‌شود که بدن به آن‌ها نیازی ندارد. سرطان ریه نوعی بیماری است که مشخصه آن رشد کنترل نشده سلول در بافت‌های ریه است. اگر این بیماری تحت درمان قرار نگیرد، رشد کنترل نشده سلولی می‌تواند در فرآیندی به نام متاستاز به بیرون از ریه گسترش پیدا کند و به بافت‌های اطراف یا سایر اعضای بدن برسد (۲۰). متأسفانه بسیاری از افراد مبتلا به این بیماری، در مراحل پیشرفته



نمودار-۵. میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن از سلول‌های سرطانی ریه بعد از تیمار در گروه‌های مختلف مطالعه (* نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۵$)، ** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۱$)، *** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۱$) و **** نشان‌دهنده معناداری در سطح ($P<۰/۰۰۰۱$)). (ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی (NDV+EP) یا بدون پالس‌های الکتریکی (EP)).

سرطان تشخیص داده می‌شوند و اگرچه داروهای جدید می‌توانند زیر مجموعه‌های کوچکی از این بیماران را بهبود ببخشند، ولی بقای کلی نامساعد است و تعداد زیادی از مبتلایان در عرض چند ماه پس از تشخیص، از دنیا می‌روند. روش‌های مختلفی برای درمان سرطان وجود دارند و استفاده از هر کدام آن‌ها، به نوع و شدت سرطان بستگی دارند (۲۱). استفاده از داروهای ضد سرطانی شامل کموتراپی، هورمون تراپی، ایمونوتراپی و هدف درمانی بخش اعظم روش‌های درمانی سرطان را تشکیل می‌دهند. داروهای ضد سرطانی ممکن است به صورت تک دارویی یا رژیم چند دارویی تجویز شوند. طبق مطالعات مختلف تاثیر داروها وقتی به صورت ترکیبی تجویز می‌شوند، بیشتر خواهند بود. به منظور ایجاد اثرات بیشتر، می‌توان از داروها با مکانیسم عمل متفاوت استفاده کرد به طوری که سمیت محدود کننده دز ترکیبات با هم متفاوت باشد (۲۲). به طور ایده‌آل با ترکیب داروهای دارای اثرات متفاوت با هم، هر دارو در دز بهینه خود، بدون بروز اثرات جانبی غیر قابل تحمل مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین هدف رژیم‌های دارویی ترکیبی افزایش کارایی و کاهش سمیت است. امروزه محققان درصدد یافتن روش‌های جایگزین با تکیه بر ترکیبات طبیعی به منظور کاهش عوارض داروهای شیمی درمانی و کاهش دز مصرف داروها می‌باشند (۲۳). از اواسط دهه ۱۸۰۰ به دنبال مشاهدات متخصصان از بهبود علائم بیماران مبتلا به تومور متعاقب ابتلا به عفونت‌های طبیعی، ایده استفاده از باکتری‌ها و ویروس‌ها برای درمان بدخیمی‌های انسانی قدرت گرفت. از ویروس‌های انکولیتیک می‌توان به عنوان یک روش نوظهور از درمان‌های نوین سرطان یادکرد که با تکثیر انتخابی در سلول‌های توموری، قابلیت انتقال ژن های ضد توموری، القای مرگ سلولی ایمونوژنیک و ارتقای ایمنی ضد توموری و ... موجب افزایش کارآیی روش‌های درمانی سرطانی می‌شوند (۲۴).

ویروس بیماری نیوکاسل یک پارامیکسوویروس پرندگان است که نشان داده شده است که دارای فعالیت انکولیتیک قابل توجهی در برابر سرطان پستانداران است. با توجه به بیماری‌زا بودن اغلب پاتوژن‌های انسانی، ویروس‌های حیوانی به عنوان یک جایگزین مورد بررسی قرار گرفتند و امروزه ویروس بیماری نیوکاسل تبدیل به یک عامل انکولیتیک امیدوارکننده شده است (۲۵). نفوذ نسبتاً ضعیف ویروس‌های انکولیتیک به داخل تومور از محدودیت‌های اصلی ویروس درمانی انکولیتیک، است (۱۱،۲۶). شنکایی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه خود چنین اظهار کردند که در اغلب روش‌های درمانی نیاز است موادی که قابلیت نفوذ به داخل غشا را ندارند به طور گسترده‌ای وارد سلول شوند. در نتیجه طراحی و دست‌یابی به روش‌هایی که موجب افزایش نفوذپذیری در هنگام استفاده از داروهای مختلف و ژن‌ها ضروری است. منفذسازی الکتریکی سلول‌ها (منفذسازی الکتریکی) روشی نوین است که باعث افزایش نفوذپذیری الکتریکی سلول‌ها می‌شود. با اعمال ولتاژهای الکتریکی بیش از آستانه تراوایی غشای یاخته، می‌توان منفذهای غشایی در سلول ایجاد کرد. این روش کاربردهای متفاوتی در ورود مولکول‌های غیرقابل نفوذ به داخل سیتوپلاسم سلولی دارد که همراه کردن این پالس‌ها با داروهای شیمی درمانی مانند بلومایسین و سیس پلاتین که به شیمی درمانی الکتریکی معروف است، به عنوان مهمترین کاربردهای ضد سرطانی این روش شناخته می‌شود (۲۷). بنابراین هدف از مطالعه حاضر افزایش پتانسیل ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل با پالس‌های الکتریکی در رده سلولی سرطان ریه می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان سمیت، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آزاد سازی لاکتات دهیدروژناز در گروه تحت تیمار با ویروس بیماری نیوکاسل به همراه پالس‌های الکتریکی نسبت به سایر گروه‌های درمانی و

گروه کنترل افزایش معناداری دارد. یورچنکو و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ویروس بیماری نیوکاسل می‌تواند به طور انتخابی سلول‌های بدخیم را بدون اینکه تاثیری بر سلول‌های سالم بگذارد، از بین ببرد. در این مطالعه اثر انکولیتیک ۴۴ ایزوله ویروس بیماری نیوکاسل در ۴ رده سلولی انسانی متفاوت از نظر هیستوژنتیکی (HCT116، HeLa، A549، MCF7) مورد بررسی قرار گرفته است. بی خطری سویه‌های مختلف در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی طبیعی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ویروس بیماری نیوکاسل به طور انتخابی موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی منتخب شده اما تاثیر آن بر روی سلول‌های تک هسته‌ای کمتر است (۲۸). مظفری نژاد و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که ویروس بیماری نیوکاسل موجب افزایش آپوپتوز، آزادسازی لاکتات دهیدروژناز، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش میزان زنده‌مانی سلولی سرطانی در شرایط کشت سلولی می‌گردد (۲۹). به طور کلی مطالعات متعددی اثرات ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل را در راستای نتایج مطالعه ما تائید کرده‌اند (۳۵-۳۰). با وجود دستکاری‌های ژنتیکی زیادی که در مطالعات مختلف انجام شده است، اما همچنان محدودیت نفوذ پذیری کم پابرجاست و هنوز استراتژی‌هایی برای بهبود انتقال ویروس، ویژگی و نفوذ تومور، کاهش پاکسازی ویروس و افزایش پاسخ ایمنی مبتنی بر تومور مورد نیاز است (۱۱،۳۶). تغییر ساختاری در غشای یاخته، پدیده‌ای دارای آستانه با انتخاب مناسب پهنای پالس و شدت میدان الکتریکی است؛ غشا بعد از اتمام اعمال میدان الکتریکی، به حالت طبیعی خود برگشته، در حالی که و منفذسازی الکتریکی برگشت پذیر اتفاق می‌افتد. اگر شدت یا پهنای پالس از حدی بیشتر باشد، یاخته، توانایی برگشت به حالت عادی خود را ندارد و غشای آن و در نتیجه خود یاخته از بین می‌رود که در این صورت منفذسازی الکتریکی برگشت ناپذیر رخ داده است (۱۲). به دلیل افزایش تراوایی بالا و کم هزینه بودن این روش، منفذسازی الکتریکی به سرعت در انتقال ژن، تهیه آنتی‌بادی‌های تک‌کلونی و شیمی درمانی تومورها کاربرد یافته است. امروزه شاهد افزایش استفاده از این روش در بسیاری از شاخه‌های بیوشیمی، بیولوژی مولکولی و پزشکی هستیم؛ اگر استفاده از منفذسازی الکتریکی بازگشت پذیر را با شیمی درمانی همراه کنیم به روشی موثر به نام شیمی درمانی الکتریکی در درمان تومورهای سرطانی دست خواهیم یافت (۱۲). یادگار دهکرودی و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که شدت میدان‌های پایین با فرکانس بالا در شرایط کشت سلولی موجب کاهش زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی سینه انسانی می‌شود که در مقایسه با گروه کنترل مشخص گردید که شدت میدان‌های پایین با فرکانس بالا در همراهی با داروی شیمی درمانی موجب کاهش بقا و افزایش نفوذپذیری می‌شود (۱۲). طبق گزارشات شنکایی و همکاران (۲۰۱۳)، شدت میدان‌های پایین با فرکانس بالا در کاهش رشد تومور تاثیر زیادی دارند و نقش مهمی را در توانایی کاهش حجم تومور دارا می‌باشد و افزایش فرکانس سبب می‌شود تا توانایی پالس‌های الکتریکی در کاهش حجم تومور به طور معناداری افزایش یابد (۳۷). نتایج مطالعه ما نیز در راستای مطالعات مذکور نشان داد که ویروس درمانی به همراه شدت میدان پایین با فرکانس بالا موجب افزایش نفوذپذیری و آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ریه می‌گردد که برای تائید نهایی نیازمند انجام مطالعات حیوانی و بررسی‌های بیشتر در سطح مولکولی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه درمانی که تحت تیمار با ویروس بیماری نیوکاسل به همراه پالس‌های الکتریکی قرار گرفتند، میزان سمیت، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز نسبت به گروه‌های دیگر درمانی و گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که پالس‌های الکتریکی باعث افزایش پتانسیل ضد سرطانی ویروس بیماری نیوکاسل در سلول‌های سرطان ریه می‌شود و می‌تواند به عنوان یک رهیافت نوین درمانی در جهت افزایش کارآیی ویروس‌های انکولیتک مورد استفاده قرار گیرد.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- استفاده از درمان‌های نوین به جای استفاده از درمان‌های رایج مانند شیمی درمانی برای مصدومین شیمیایی مخصوصا جانبازان شیمیایی مبتلا به سرطان ریه
- استفاده از درمان‌های ترکیبی (ویروس‌های انکولیتیک و درمان‌های استاندارد) که کارآزمایی بالینی آن‌ها اثبات شده است و اثربخشی کاملا مؤثری دارند برای سایر جانبازان و نظامیان درگیر با عوامل شیمیایی و بیماری‌های سرطانی

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) با کد IR.BMSU.REC.1400.084 می‌باشد. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌نمایند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to

other countries: a review article. Iranian Journal of Public Health. 2018;47(3):309.
2. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. Nature. 2018;553(7689):446-54. doi:10.1038/nature25183
3. Montagne F, Guisier F, Venissac N, Baste JM. The Role of Surgery in Lung Cancer Treatment: Present Indications and Future Perspectives-State of the Art. Cancers. 2021;13(15):3711. doi:10.3390/cancers13153711
4. Anggondowati T, Ganti AK, Islam KMM. Impact of time-to-treatment on overall survival of non-small cell lung cancer patients-an analysis of the national cancer database. Translational Lung Cancer Research. 2020;9(4):1202-1211. doi:10.21037/tlcr-19-675
5. Yan Z, Zhang Z, Chen Y, Xu J, Wang J, Wang Z. Enhancing cancer therapy: the integration of oncolytic virus therapy with diverse treatments. Cancer Cell International. 2024;24(1):242. doi:10.1186/s12935-024-03424-z
6. Wan PK, Fernandes RA, Seymour LW. Oncolytic viruses and antibodies: are they more successful when delivered separately or when engineered as a single agent? J Immunother Cancer. 2023;11(8): e006518. doi:10.1136/jitc-2022-006518
7. Li Q, Oduro PK, Guo R, Li R, Leng L, Kong X, et al. Oncolytic Viruses: Immunotherapy Drugs for Gastrointestinal Malignant Tumors. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022;12: 921534. doi:10.3389/fcimb.2022.921534
8. Naz D, ur Rahman S, Aslam MA, Muhammad F. Newcastle disease virus in poultry with an interface as a human vector. Veterinary Vaccine. 2022; 1(1):100003. doi:10.1016/j.vetvac.2022.100003
9. Yang H, Tian J, Zhao J, Zhao Y, Zhang G. The Application of Newcastle Disease Virus (NDV): Vaccine Vectors and Tumor Therapy. Viruses. 2024;16(6):886. doi:10.3390/v16060886
10. Huang F, Dai C, Zhang Y, Zhao Y, Wang Y, Ru G. Development of Molecular Mechanisms and Their Application on Oncolytic Newcastle Disease Virus in Cancer Therapy. Frontiers in Molecular Biosciences. 2022;9:889403. doi:10.3389/fmolb.2022.889403
11. Zheng M, Huang J, Tong A, Yang H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. Molecular Therapy - Oncolytics. 2019; 15:234-47. doi:10.1016/j.omto.2019.10.007
12. Yadegari-Dehkordi S, Firoozabadi SM, Forouzandeh Moghadam M, Shankayi Z. Role of Endocytosis Pathways in Electropermeablization of MCF7 Cells Using Low Voltage and High Frequency Electrochemotherapy. Cell Journal. 2021;23(4):445-50. doi:10.22074/cellj.2021.7203
13. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. European Journal of Surgical Oncology. 2008;34(2):232-40. doi:10.1016/j.ejso.2007.05.016
14. Mofid B, Shankayi Z, Novin K, Dehghani S, Shankayi M, Haghighatkhah H, et al. Effective treatment of cervical lymph node metastasis of breast cancer by low voltage high-frequency electrochemotherapy. Acta Medica Iranica. 2017: 268-71.
15. Shankayi Z, Firoozabadi SM, Hassan ZS. Optimization of electric pulse amplitude and frequency *in vitro* for low voltage and high frequency electrochemotherapy. Journal of Membrane Biology. 2014;247(2):147-54. doi:10.1007/s00232-013-9617-9
16. Gouvarchinghaleh HE, Jalili C, Nasta MZ, Mokhles F, Afrasiab E, Babaei F. Synergistic effects of Bacillus coagulans and Newcastle disease virus on human colorectal adenocarcinoma cell proliferation. Iranian Journal of Microbiology. 2024;16(1):97-103. doi:10.18502/ijm.v16i1.14878
17. Dodangeh F, Sadeghi Z, Maleki P, Raheb J. Long non-coding RNA SOX2-OT enhances cancer biological traits via sponging to tumor suppressor miR-122-3p and miR-194-5p in non-small cell lung carcinoma. Scientific Reports. 2023;13(1):12371. doi:10.1038/s41598-023-39000-0
18. Ghadaksaz A, Imani Fooladi AA, Mahmoodzadeh Hosseini H, Nejad Satari T, Amin M. ARA-linker-TGFαL3: a novel chimera protein to target breast cancer cells. Medical Oncology. 2021;38(8):96. doi:10.1007/s12032-021-01546-2
19. Miri A, Esmaeili Gouvarchinghaleh H, Ghorbani Alvanegh A, Jajarmi V. Investigating the Effects of Peiminine and Hyperthermia Therapy on the Induction of Apoptosis in MCF-7 Cell Line. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2023;33(225):84-93.
20. Dede Z, Tumer K, Kan T, Yucel B. Current Advances and Future Prospects in Cancer Immunotherapeutics. Medeniyet Medical Journal. 2023;38(1):88-94. doi:10.4274/MMJ.galenos.2023.29599
21. Mikhail Lette MN, Paez D, Shulman LN, Guckenberger M, Douillard JY, Oyen WJG, et al. Toward Improved Outcomes for Patients With Lung Cancer Globally: The Essential Role of Radiology and Nuclear Medicine. JCO Global Oncology. 2022;8:e2100100. doi:10.1200/GO.21.00100
22. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. Genes & Diseases. 2022;10(4):1367-401. doi:10.1016/j.gendis.2022.02.007
23. Correia AS, Gärtner F, Vale N. Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer. Heliyon. 2021;7(1): e05948. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e05948
24. Krzykawski MP. Combined bacterial and viral treatment: a novel anticancer strategy. Central European Journal of Immunology. 2015;40(3):366-72. doi:10.5114/ceji.2015.54601
25. Javaheri A, Bykov Y, Mena I, García-Sastre A, Cuadrado-Castano S. Avian Paramyxovirus 4 Antitumor Activity Leads to Complete Remissions and Long-term Protective Memory in Preclinical Melanoma and Colon Carcinoma Models. Cancer

Research Communications. 2022;2(7):602-615. doi:10.1158/2767-9764.crc-22-0025
26. Guedan S, Rojas JJ, Gros A, Mercade E, Cascallo M, Alemany R. Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth. Molecular Therapy. 2010;18(7):1275-83. doi:10.1038/mt.2010.79
27. Shankaii Z, Firoozabadi S. Electroporation of Cells Using Electric and Magnetic Fields with Approach of Cancer Treatment: A Review Article. JMBS. 2018;9(2):247-58.
28. Yurchenko KS, Zhou P, Kovner AV, Zavjalov EL, Shestopalova LV, Shestopalov AM. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model. PLoS One. 2018;13(4):e0195425. doi:10.1371/journal.pone.0195425
29. Mozaffari Nejad AS, Fotouhi F, Mehrbod P, Keshavarz M, Alikhani MY, Ghaemi A. Oncolytic effects of Hitchner B1 strain of newcastle disease virus against cervical cancer cell proliferation is mediated by the increased expression of cytochrome C, autophagy and apoptotic pathways. Microbial Pathogenesis. 2020;147:104438. doi:10.1016/j.micpath.2020.104438
30. Wu Q, Jin Y, Li S, Guo X, Sun W, Liu J, et al. Oncolytic Newcastle disease virus carrying the IL24 gene exerts antitumor effects by inhibiting tumor growth and vascular sprouting. In. International Immunopharmacology. 2024;136:112305. doi:10.1016/j.intimp.2024.112305
31. Zaher KA, Alrahimi JS, Basingab FS, Aldahlawi AM. Newcastle Disease Virus Virotherapy: Unveiling Oncolytic Efficacy and Immunomodulation. Biomedicines. 2024;12(7):1497. doi:10.3390/biomedicines12071497
32. Sun Y, Tang L, Kan X, Tan L, Song C, Qiu X, et al. Oncolytic Newcastle disease virus induced degradation of YAP through E3 ubiquitin ligase PRKN to exacerbate ferroptosis in tumor cells. Journal of Virology. 2024;98(3):e0189723. doi:10.1128/jvi.01897-23
33. Rossmeisl JH, King JN, Robertson JL, Weger-Lucarelli J, Elankumaran S. Phase I/II Trial of Urokinase Plasminogen Activator-Targeted Oncolytic Newcastle Disease Virus for Canine Intracranial Tumors. Cancers. 2024;16(3):564. doi:10.3390/cancers16030564
34. Sharifi N, Bouzari M, Keyvani H, Mehdi Ranjbar M. The effects of the LaSota strain of oncolytic Newcastle disease virus vaccine on cervical intraepithelial neoplasia Patients-Clinical cohort study. International Immunopharmacology. 2024;126:111296. doi:10.1016/j.intimp.2023.111296
35. Liao T, Chen Y, Guo L, Zhu S, Zhan T, Lu X, et al. The NP protein of Newcastle disease virus dictates its oncolytic activity by regulating viral mRNA translation efficiency. PLOS Pathogens. 2024;20(2):e1012027. doi:10.1371/journal.ppat.1012027
36. Aurelian L. Oncolytic virotherapy: the questions and the promise. Oncolytic Virotherapy. 2013;2:19-29. doi:10.2147/OV.S39609
37. Shankaei Z, Firoozabadi M, SarafHasan Z. Comparison of low voltage amplitude electrochemotherapy with 1 Hz and 5 kHz frequency in volume reduction of mouse mammary tumor in Balb/c Mice. Koomesh. 2012;13(4):e152540.