

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر آلفاکتوگلو تارات بر زیستایی و تکثیر سلول‌های سرطان تخمدان

حسین بیرانوند^۱، محمود تلخابی^{۱*}، منیره محمودی^۲، قمر تاج حسین^۳

۱- گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک ۳۸۴۸۱۷۷۵۸، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: m_talkhabi@sbu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۳

DOI: 10.22034/ascij.2023.1999830.1557

چکیده

سرطان تخمدان سومین سرطان شایع زنان است. بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که آلفاکتوگلو تارات (AKG) نقش مهم درمانی در بیماری‌های قلبی، عصبی و سرطان‌ها دارد. در این پژوهش، سلول‌های سرطان تخمدان (رده OVCAR-3) در پاساژ دوم از دانشگاه تهران تهیه و در محیط کشت کامل (محیط RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین) کشت شدند. به منظور بررسی زیستایی سلول‌ها از تکنیک MTT استفاده گردید. همچنین، زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی، کلونی‌زایی و مهاجرت سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سنجش MTT نشان داد که تیمار سلول‌ها با AKG باعث کاهش زیستایی به روش وابسته به غلظت می‌گردد. بر اساس نتایج سنجش MTT، غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میکرومولار AKG برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند. بررسی زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی نشان داد که هر دو غلظت مورد استفاده، رشد سلول‌ها را به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهند ($p < 0/05$). نتایج سنجش کلونی‌زایی نشان داد که غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میکرومولار AKG باعث کاهش معنی‌دار در تعداد کلونی‌های سلول‌های OVCAR-3 می‌شود ($p < 0/01$). بررسی مهاجرت سلولی نشان داد که تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مورد مطالعه، باعث کاهش معنی‌دار مهاجرت سلول‌ها به ناحیه خراش می‌گردد ($p < 0/01$). مجموعه نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که AKG زیستایی سلول‌های سرطان تخمدان را کاهش داده و عملکرد ضد تکثیری و مهاجرتی بر روی سلول‌های این سرطان دارد. به نظر می‌رسد که استفاده از AKG در کنار سایر درمان‌های موجود می‌تواند رویکرد مناسبی برای کنترل و درمان بهتر سرطان تخمدان شود.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، رده سلولی OVCAR-3، آلفا کتوگلو تارات، زیستایی، کلونی‌زایی، مهاجرت.

مقدمه

سراسر جهان ۲۰۷۲۵ زن جان خود را بر اثر ابتلا به این بیماری از دست دادند (۱۳). سن ۵۰ تا ۶۰ سالگی، شایع‌ترین سن برای وقوع سرطان تخمدان در زنان است (۱۵). عوامل متابولیک و سبک زندگی شامل سیگار کشیدن، مصرف الکل، کم‌تحركی، رژیم

سرطان بیماری است که در آن برخی از سلول‌های بدن به طور غیرقابل‌کنترلی رشد می‌کنند و می‌توانند تومورهایی در آن بافت ایجاد کنند. سرطان تخمدان سومین سرطان شایع زنان، بعد از سرطان دهانه رحم و رحم در جهان است (۲۱). در سال ۲۰۲۰، در

کننده مهم فرآیند آنتی‌اکسیدانی است که به حفظ پایداری اکسیداسیون-احیا کمک می‌کند و ثابت شده است که نقش حیاتی در بیماری‌های مختلف به عنوان مثال آسیب کبدی و آسیب مغزی دارد (۵). AKG که با نام ۲-کتوگلووتاریک اسید نیز شناخته می‌شود (۹)، یک واسطه حیاتی از چرخه کربس (TCA) است و نقش مهمی در فرآیندهای متابولیسمی متعدد در حیوانات و انسان دارد. AKG نقش مهمی در حفظ سطوح کربوکسیلاسیون برای ترمیم نقص‌های میتوکندری در سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند (۱۱). تجویز خوراکی AKG با اعمال آنتی‌اکسیدان آن در ارگانسیم‌های پیر، خاصیت ارتجاعی عروق خونی را بهبود می‌بخشد (۱۲، ۱۷). AKG بیان HIF- α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) اریتروپویتین و VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) را تحت شرایط هیپوکسیک در رده سلولی Hep3B (Hepatocellular Carcinoma) به میزان معنی داری کاهش می‌دهد (۱۴). بررسی اثر ضد تکثیری مستقیم AKG بر رده‌های سلولی آدنوکارسینوم کولون در شرایط عادی نشان داد که AKG نه تنها از تکثیر سلول‌های رده آدنوکارسینوم کولون به میزان معنی داری جلوگیری کرده، بلکه سنتز DNA را نیز مهار می‌کند (۱۹). نشان دادند که مکمل AKG پیام‌رسانی Wnt را سرکوب کرده و تمایز سلولی را القاء کرده و رشد تومور را به طور قابل توجهی محدود می‌کند (۲۲). AKG منجر به اتوفازی، مرگ سلولی و آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطانی استخوان (رده MHM, SJS1) و ریه (رده A549) می‌گردد (۶). تحقیقات انجام شده در مورد AKG نشان می‌دهند که این ماده زیستی ممکن است در کنترل رفتار سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد. پژوهش حاضر به بررسی اثر AKG بر روی رده سلولی OVCAR-3 سرطان تخمدان می‌پردازد. برای

غذایی ناسالم، چاقی و دیابت از جمله عواملی هستند که باعث ایجاد سرطان می‌گردند (۱، ۲۰). تقریباً تمام تومورهای خوش‌خیم و بدخیم تخمدان از سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های استرومایی یا سلول‌های زایا منشأ می‌گیرند. ۱۰ درصد از سرطان‌های تخمدان ناشی از عوامل ژنتیکی می‌باشد که شایع‌ترین این عوامل جهش در ژن‌های BRCA1 یا BRCA2 است (۱۸). سرطان تخمدان بر اساس تغییرات ژنتیکی به دو گروه تقسیم می‌شود: گروه اول شامل تومورهای درجه پایین با جهش در KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) و PIK3CA و از دست دادن هتروزیگوسیتی (LOH) در کروموزوم Xq هستند و گروه دوم شامل تومورهای درجه بالا با اختلال در عملکرد TP53 (Tumor protein p53)، BRCA1 و BRCA2 می‌باشند (۳). OVCAR-3 یک رده سلولی سرطانی تخمدان با ریخت اپیتلیالی تک لایه سنگفرشی است که رشد بالایی دارد. این رده به عنوان مدل کارسینوم سروری درجه بالا (HGSO) می‌باشد که در سال ۱۹۸۲ از HGSO ایجاد گردید (۸) OVCAR-3 یکی از گسترده‌ترین رده‌های سلولی سرطان تخمدان است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که سلول‌های OVCAR-3 با از دست دادن عملکرد TP53 و تعداد بسیار بالایی از داده‌های ژنومی منتشر شده به عنوان HGSOs شناخته می‌شوند. همچنین عنوان گردید که سلول‌های رده OVCAR-3 در برابر مهارکننده‌های ATR مقاوم هستند (۴). آلفاکتوگلووتارات (AKG) در حال حاضر به صورت تجاری به عنوان یک مکمل غذایی در دسترس است و مکمل آن با گلوتامین، آرژنین یا اورنیتین اخیراً برای بهبود عملکردهای ایمنی ضد سرطان در نظر گرفته شده است (۱۹). AKG یک ماده زیستی امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های بالینی در حیوانات و انسان می‌باشد. علاوه بر این یک تنظیم

بررسی نقش AKG در این سلول‌ها، زیستایی، تکثیر سلول‌ها، کلونی‌زایی سلول‌ها، زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی و مهاجرت سلول‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت سلول‌های OVCAR-3: سلول‌های OVCAR-3 در پاساژ دوم از آزمایشگاه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه تهران تهیه گردید. سلول‌ها با استفاده از محیط کشت کامل (محیط RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین) کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۰ درصد و CO₂ ۵ درصد نگهداری شدند.

بررسی زیستایی سلول‌های OVCAR-3 با روش MTT: تعداد ۵۰۰۰ سلول OVCAR-3 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف AKG (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰ میکرومولار (μM)) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. هر گروه با ۳ تکرار در نظر گرفته شدند. محیط سلول‌های هر چاهک جمع‌آوری و سلول‌ها با استفاده از PBS (Phosphate buffered saline) شستشو شدند. میزان ۱۵ میکرولیتر محلول نمک تترازولیوم بروماید با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درون هر چاهک اضافه گردید (۱۹). بعد از گذشت ۲ الی ۳ ساعت، محلول نمکی را برداشته سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک افزوده گردید و بعد از ۱۰ دقیقه جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری (BioTek® 800™ T) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی زمان دوبرابر شدن جمعیت سلول‌های OVCAR-3: برای این منظور، تعداد ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار از AKG تیمار شدند. گروه کنترل ماده AKG دریافت نکرد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت از زمان تیمار، محلول رویی سلول‌ها دور ریخته شد و سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف چاهک‌ها جدا شدند. میزان ۱۰ میکرولیتر از محیط حاوی سلول‌ها روی لام نئوبار قرار گرفت و شمارش سلول‌ها انجام شد. اعداد بدست آمده با فرمول دوبرابر شدن جمعیت سلولی (www.omnicalculator.com) محاسبه شد. فرمول محاسبه زمان دوبرابر شدن جمعیت

$$\text{Doubling Time} = \frac{\text{Duration} \cdot \ln(2)}{\ln\left(\frac{\text{Final Concentration}}{\text{Initial Concentration}}\right)}$$

فرمول محاسبه میزان دوبرابر شدن جمعیت سلولی:

$$\text{Growth Rate} = \frac{\ln\left(\frac{\text{Final Concentration}}{\text{Initial Concentration}}\right)}{\text{Duration}}$$

بررسی توانایی کلونی‌زایی سلول‌های OVCAR-3: تعداد ۱۵۰ عدد سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار از AKG تیمار شدند. گروه کنترل ماده AKG دریافت نکرد. سلول‌ها به مدت ۱۴ روز تیمار شدند. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج ده و سلول‌ها با استفاده از فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه فرمالین دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر رنگ کریستال ویوله به هر چاهک اضافه گردید. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Primovert, ZEISS) شمارش شدند.

بررسی روند مهاجرت سلول‌های OVCAR-3: برای ارزیابی مهاجرت از روش ایجاد خراش (Scratch assay) استفاده شد. ابتدا در هر چاهک پلیت ۶ خانه، تعداد ۱۰۰ هزار سلول کشت شد. بعد از رسیدن تراکم

۱۲۰ و ۱۸۰ میکرومولار AKG حدود (۷۰ درصد) بود و از نظر آماری کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p < ۰/۰۱$). براساس نتایج حاصل از آزمایش، غلظت ۱۲۰ میکرومولار با زیستایی حدود (۶۰ درصد) از نظر آماری کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p < ۰/۰۱$) داشت. همچنین غلظت ۶۰ میکرومولار با زیستایی حدود (۸۰ درصد) باعث کاهش معنی دار در زیستایی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شد ($p < ۰/۰۵$). این دو غلظت برای ادامه مطالعه انتخاب گردیدند (شکل ۱).

بررسی زمان دو برابر شدن جمعیت سلول‌های OVCAR-3: بررسی چاهک‌ها نشان داد که تراکم سلول‌ها در چاهک‌های گروه ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار AKG به نسبت گروه کنترل کمتر می‌باشد که نشان دهنده کاهش رشد سلول‌ها برای این دو گروه تیمار به نسبت گروه کنترل است (شکل ۲-A). نمودار جمعیت دو برابر شده سلول‌های OVCAR-3 نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت جمعیت سلولی در گروه کنترل ۱۹×10^5 سلول بود و در گروه تیمار ۶۰ میکرومولار AKG تعداد ۱۵×10^5 سلول بود که از نظر آماری کاهش معنی داری بین گروه تیمار و کنترل وجود داشت ($p < ۰/۰۱$). در گروه تیمار با غلظت ۱۲۰ میکرومولار AKG تعداد ۱۱×10^5 سلول بود که از نظر آماری کاهش معنی داری به نسبت گروه کنترل داشت ($p < 0.001$). میانگین تعداد سلول برای گروه تیمار ۶۰ میکرومولار ۱۵۶×10^4 سلول و برای غلظت ۱۲۰ میکرومولار ۱۰۶ سلول بود. دو گروه تیمار از نظر آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر داشتند ($p < ۰/۰۱$) (شکل ۲-B). نتایج بررسی زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی نشان می‌دهد که زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی در گروه کنترل تقریباً هر ۱۶ ساعت بود. زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی در گروه تیمار ۶۰ میکرومولار هر ۲۰ ساعت بود که از نظر

سلول‌های درون چاهک به بالای ۸۰ درصد، محیط رویی سلول‌های هر چاهک تخلیه و میزان ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول میتومايسين (Health Biotech Ltd) درون محیط کشت هر چاهک حل شد و میزان ۲ الی ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس با سرسمپلر زردرنگ خراشی یکسان در همه چاهک‌ها ایجاد گردید. هر چاهک با PBS شستشو داده شد و بعد از عکس‌برداری در روز خراش، سلول‌ها با غلظت ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار از AKG تیمار شدند. گروه کنترل ماده AKG دریافت نکرد. پهنای ناحیه خراش به صورت روزانه و به مدت ۳ روز با استفاده از میکروسکوپ معکوس عکس‌برداری شد. **آنالیز آماری:** در این پژوهش از نرم‌افزار گراف پد (پریزم) جهت بررسی داده‌ها استفاده گردید. تمام آنالیزها با استفاده از نتایج ۳ بار تکرار زیستی انجام شده است. نتایج حاصل با استفاده از تست آماری ANOVA یکطرفه (آنالیز Brown-Forsythe) و دوطرفه (Sidak) در سطوح معنی داری * ($p < ۰/۰۵$), ** ($p < ۰/۰۱$) و *** ($p < ۰/۰۰۱$) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

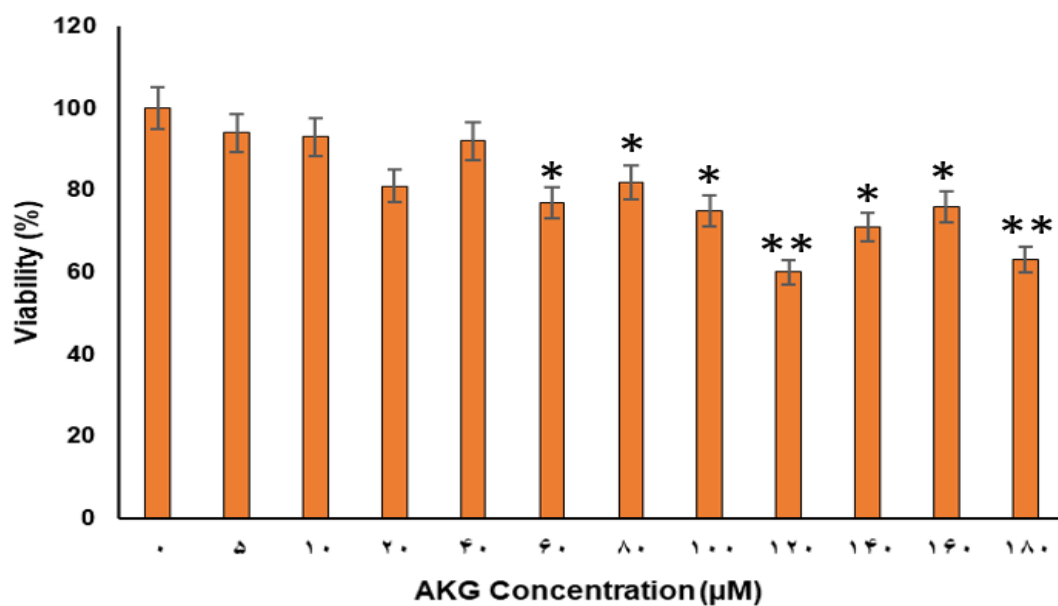
بررسی زیستایی سلول‌های OVCAR-3 با روش MTT: بررسی زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT نشان داد که هر چه غلظت تیمار با AKG زیاد شود، میزان زیستایی سلول‌ها کم‌تر می‌گردد (شکل ۱). زیستایی سلول‌ها در غلظت‌های (۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) به میزان (۸۰-۹۵ درصد) بوده و از نظر آماری با گروه کنترل اختلاف معنی دار نداشت. میزان زیستایی سلول‌ها در غلظت‌های (۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۴۰ و ۱۶۰ میکرومولار) حدود (۸۰-۶۵ درصد) بوده و کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشت ($p < ۰/۰۵$). میزان زیستایی سلول‌ها در غلظت‌های

کلونی‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۳-
B).

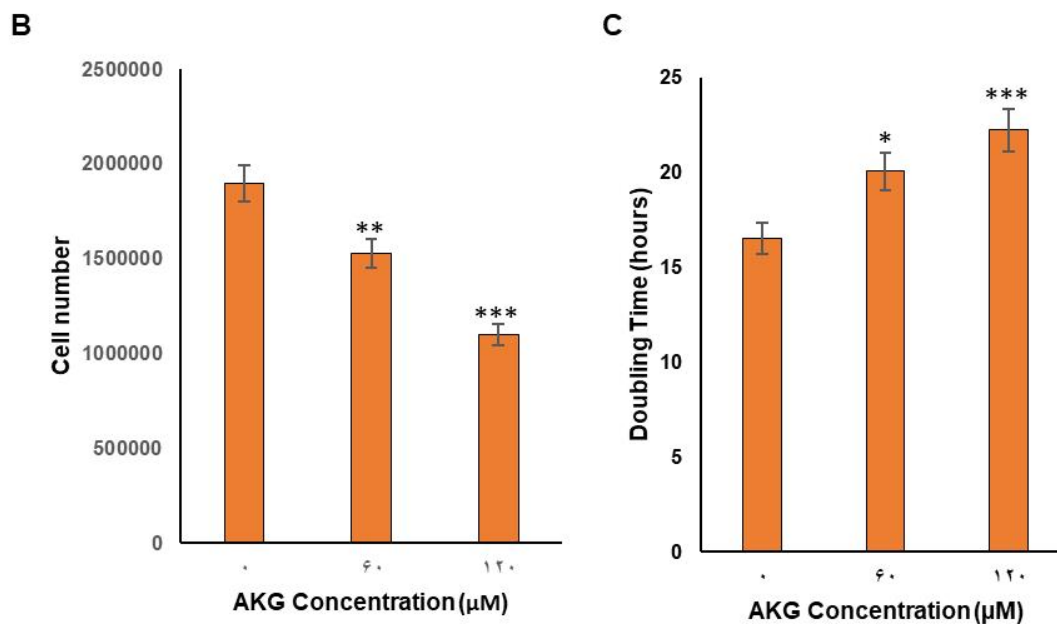
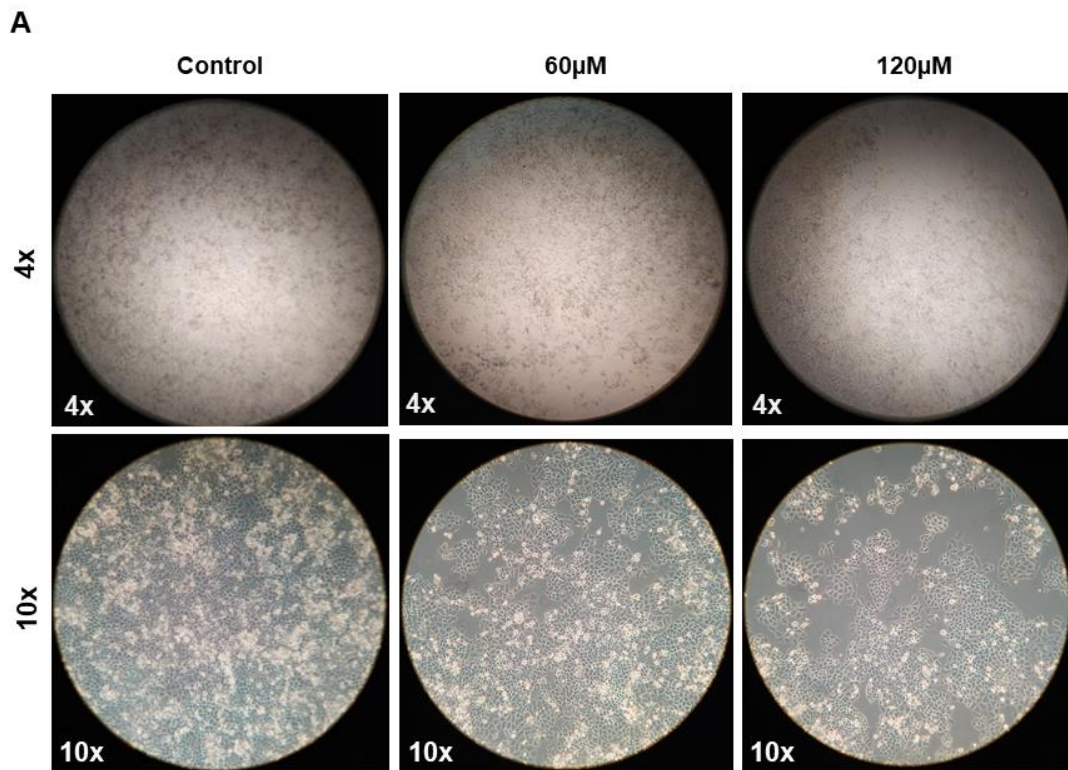
مهاجرت سلول‌های OVCAR-3: بررسی مهاجرت سلول‌های OVCAR-3 طی ۷۲ ساعت نشان داد که سلول‌های گروه تیمار شده با غلظت ۱۲۰ میکرومولار AKG به نسبت گروه کنترل در مدت زمان بیشتری خراش ایجاد شده را پر کردند (شکل ۴). گروه کنترل به نسبت گروه تیمار در مدت زمان کمتری و با تعداد بیشتری سلول، خراش ایجاد شده را پر کرد. بنابراین مهاجرت سلولی در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار AKG کمتر بوده و تیمار سلول‌ها با AKG باعث کاهش مهاجرت می‌گردد (شکل ۴-**A**). بررسی کمی نشان می‌دهد که ۲۴ ساعت بعد از تیمار، اندازه خراش در گروه کنترل ۶۵۰ پیکسل بود و در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار ۷۹۷ پیکسل بود که از نظر آماری افزایش معنی‌داری بین گروه تیمار و کنترل وجود داشت ($p < 0/05$). ۴۸ ساعت بعد از تیمار، اندازه خراش در گروه کنترل ۴۹۲ پیکسل بود و در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار ۶۸۴ پیکسل بود که این دو گروه در ۴۸ ساعت بعد از تیمار از نظر آماری افزایش معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). ۷۲ ساعت بعد از تیمار AKG، اندازه خراش ایجاد شده در گروه کنترل ۳۵۵ پیکسل بود و در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار ۵۳۹ پیکسل بود و افزایش قابل توجهی در مهاجرت سلولی بین گروه تیمار و کنترل وجود داشت ($p < 0/01$) (شکل ۴-**B**).

آماری کاهش معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($0/05 < p$). زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار هر ۲۲ ساعت بود که از نظر آماری کاهش معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($0/01 < p$). میانگین زمان برای دو برابر شدن جمعیت سلولی در گروه تیمار ۶۰ میکرومولار ۲۰ ساعت و برای غلظت ۱۲۰ میکرومولار ۲۲ ساعت بود. دو گروه تیمار ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. طبق این یافته‌ها، زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار بیشتر از گروه ۶۰ میکرومولار بود و زمان بیشتری برای دو برابر شدن لازم داشتند (شکل ۲-**C**).

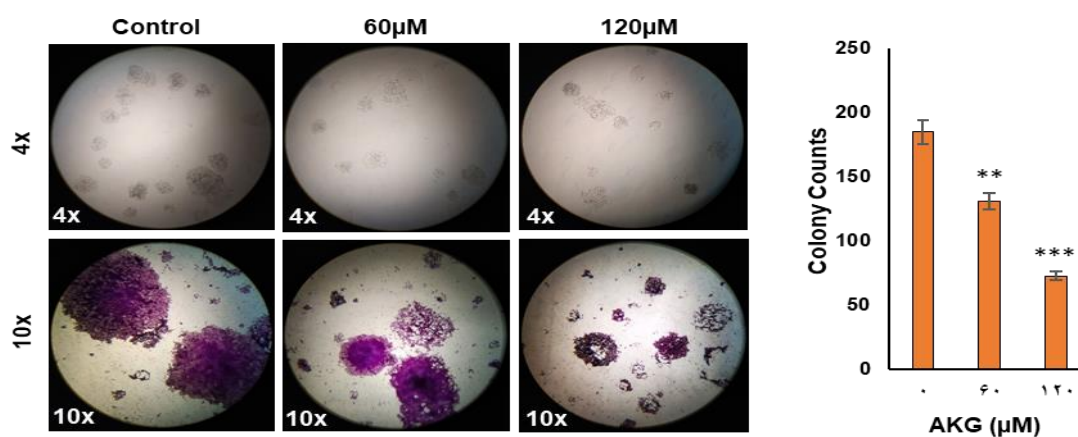
بررسی کلونی‌زایی سلول‌های OVCAR-3: بررسی تعداد کلونی‌ها بعد از ۱۴ روز نشان داد که تعداد کلونی‌ها در گروه‌های تیمار ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار AKG کمتر از گروه کنترل می‌باشد (شکل ۳). این کاهش تعداد کلونی‌ها در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار مشهودتر است (شکل ۳-**A**). شمارش تعداد کلونی بعد از ۱۴ روز نشان داد که تعداد کلونی‌ها در گروه کنترل ۱۹۰ کلونی بود. در گروه تیمار ۶۰ میکرومولار AKG تعداد کلونی‌ها ۱۳۱ بود که از نظر آماری کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت ($0/01 < p$). در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار AKG تعداد ۷۳ کلونی بود و از نظر آماری کاهش قابل توجهی با گروه کنترل داشت ($0/01 < p$). این نتیجه نشان می‌دهد که با افزایش غلظت AKG، تعداد



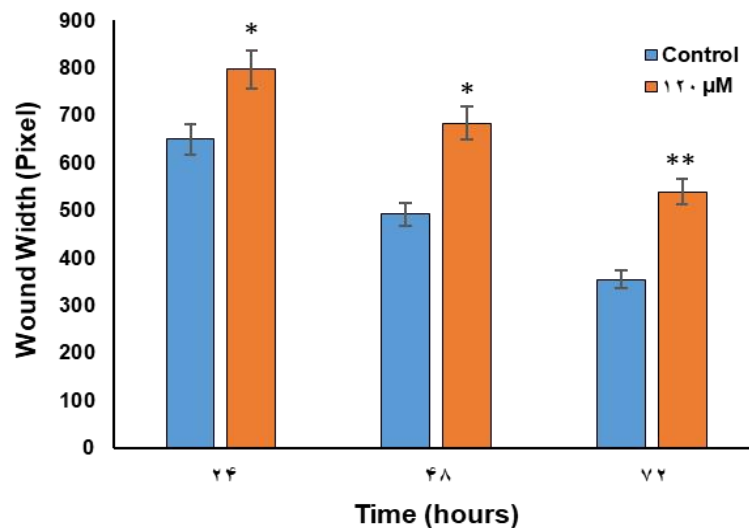
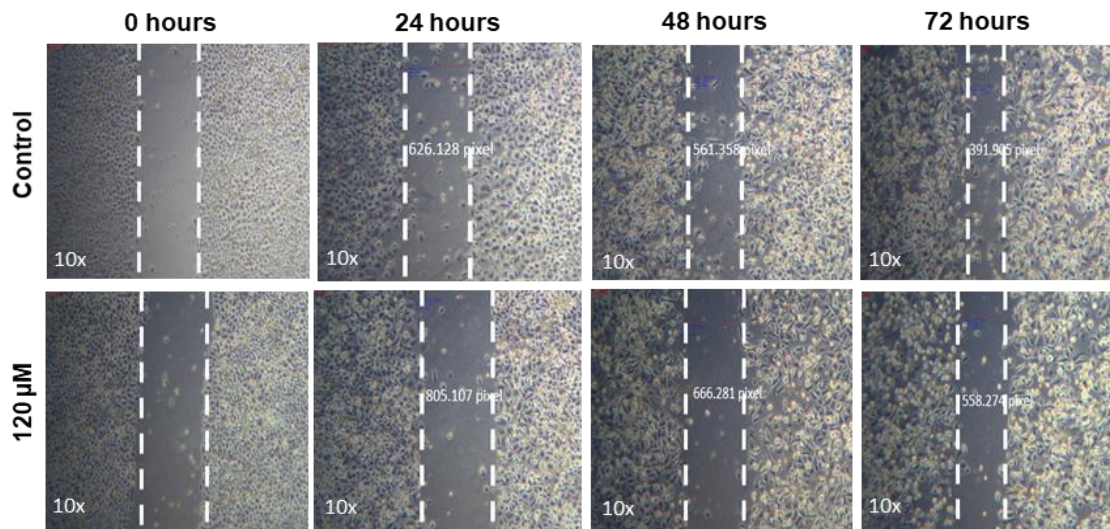
شکل ۱- زیستایی سلول‌های OVCAR-3 تیمار شده با غلظت‌های مختلف AKG. زیستایی حدود ۸۰ درصد سلول‌های OVCAR-3 در غلظت ۶۰ میکرومولار و زیستایی حدود ۶۰ درصد در غلظت ۱۲۰ و ۱۸۰ میکرومولار مشاهده شد ($p < 0.01$)^{**} و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل؛ آزمون ANOVA یکطرفه).



شکل ۲- بررسی زمان دو برابر شدن جمعیت سلول‌های OVCAR-3 تیمار شده با AKG. A. بررسی تراکم سلول‌های OVCAR-3 بعد از تیمار ۷۲ ساعته با غلظت‌های ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار AKG. تراکم سلول‌های در گروه‌های تیمار شده از گروه کنترل کمتر می‌باشد. در واقع سلول‌های گروه‌های تیمار برای افزایش تراکم سلولی به مدت زمان بیشتری نیاز دارند. B. میزان رشد سلول‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت در گروه‌های تیمار به نسبت گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد. C. زمان دو برابر شدن جمعیت سلول‌ها در گروه‌های تیمار به نسبت گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$ و $p < 0.01$ **) در مقایسه با گروه کنترل؛ آزمون ANOVA یکطرفه).



شکل ۳- تاثیر AKG بر پتانسیل کلونی زایی سلول‌های OVCAR-3. A. تصاویر کلونی‌های سلول‌های OVCAR-3 در گروه کنترل و تیمار قبل و بعد از رنگ‌آمیزی. مقایسه تصاویر نشان می‌دهد که تعداد کلونی گروه‌های تیمار ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار کمتر از گروه کنترل است. B. تعداد کلونی‌های سلول‌های OVCAR-3 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار دارد ($p < 0/001$ و $p < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل؛ آزمون ANOVA یکطرفه). بین دو گروه تیمار ۶۰ و ۱۲۰ میکرومولار از نظر آماری کاهش معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/01$). تعداد کلونی‌های گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار کمتر از گروه تیمار ۶۰ میکرومولار بود.



شکل ۴- تاثیر AKG بر پتانسیل مهاجرت سلول‌های OVCAR-3. A. مقایسه میزان مهاجرت سلولی گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار AKG و گروه کنترل با استفاده از ایجاد خراش. قطر خراش در گروه تیمار ۱۲۰ میکرومولار AKG به نسبت گروه کنترل در طول مدت انجام تست بیشتر بود. B. نمودار ارزیابی ایجاد خراش سلول‌های OVCAR-3. مقایسه نمودارها نشان می‌دهد که روند مهاجرت سلول‌ها برای پر کردن خراش در گروه‌های تیمار با AKG با سرعت کندتری در مدت ۲۴ ساعت ($p < 0/05$) و ۴۸ ساعت ($p < 0/05$) و ۷۲ ساعت ($p < 0/01$) در مقایسه با گروه کنترل انجام شد (N=۳، آزمون ANOVA دوطرفه).

بحث

مهمی در فرایندهای متابولیسمی سلولی دارد و اثرات مختلفی بر طول عمر و ساخت پروتئین داشته است. اما یکی از اثرات مهم این ماده، مقابله با سرطان از طریق جلوگیری از تومورزایی و متاستاز می‌باشد.

سرطان تخمدان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان می‌باشد. امروزه از روش‌های رایج درمان سرطان همچون شیمی‌درمانی و جراحی استفاده می‌شود. ماده AKG به عنوان یک واسطه از چرخه TCA، نقش

ارگانوئیدهای روده‌ای جهش یافته افزایش می‌دهد و از طریق کاهش سطح AKG درون سلولی منجر به تشکیل آدنوکارسینوم در داخل بدن می‌شود (۲۲). آن‌ها عنوان کردند که AKG هیپومتیلاسیون DNA و هیستون H3K4 را انجام می‌دهد که به ترتیب منجر به تنظیم مثبت ژن‌های مرتبط با تمایز و کاهش ژن‌های هدف Wnt می‌شود. با استفاده از ارگانوئیدهای مشتق از بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال (CRC: Colorectal Cancer Cell) و چندین مدل تومور CRC درون تنی، نشان دادند که مکمل AKG سیگنال‌دهی Wnt را سرکوب می‌کند و تمایز سلولی را ایجاد می‌کند، در نتیجه رشد تومور را به طور قابل توجهی محدود کرده و بقا را افزایش می‌دهد (۲۲). در مطالعه Greilberger و همکاران اثر افزودن محلول ترکیبی AKG + 5- HMF (Hydroxy methyl Furfural) به سلول‌های سرطان خون به منظور بررسی اثرات ضد تومور، ضد تکثیر و آپوپتوز بر روی رده‌های سلولی HF-SAR Jurkat (Human Skin Fibroblast) و Jurkat (Human T Lymphocyte Cells) انجام شد (۷). در نهایت نشان داده شد که محلول ترکیبی AKG + 5-HMF تأثیر ضد تکثیری بر سلول‌های رده Jurkat دارند و باعث کاهش فعالیت میتوکندری، افزایش فعالیت کاسپاز-۳ و اثرات القای آپوپتوز در سلول‌های رده Jurkat می‌شود که به نظر می‌رسد با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن مرتبط باشد (۷). Tseng و همکاران دریافتند که تیمار AKG منجر به کاهش قابل توجه رشد سلولی MDA-MB-231 در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد (۲۳). مطالعه Kafawaj و همکاران روی رده‌های سلولی استئوسارکوما (OS) نشان داد که AKG تکثیر هر دو رده سلولی OS را به شیوه‌ای وابسته به غلظت مهار می‌کند (۱۰). توسط فلوسایتومتری مشخص شد، AKG پیشرفت چرخه سلولی را در مرحله G1 در هر دو رده سلولی متوقف کرده که با کاهش سطح

مطالعه حاضر بر اهمیت تأثیر ماده AKG بر سرطان تخمدان پرداخته است. این موضوع از جهت اینکه سرطان تخمدان سومین نوع سرطان شایع زنان بعد از سرطان رحم و دهانه رحم می‌باشد از اهمیت خاصی برخوردار است. به نظر می‌رسد استفاده از AKG به عنوان یک ماده طبیعی در چرخه TCA می‌تواند تأثیرات مفیدی در کنترل سرطان داشته باشد (۲۴). در این مطالعه در بررسی زیستایی سلول‌های OVCAR-3 در تیمار با AKG از روش MTT استفاده گردید. نتایج نشان داد که تیمار AKG منجر به کاهش زیستایی سلول‌های OVCAR-3 می‌گردد. در مطالعه Rzeski و همکاران روی بررسی اثر AKG در مهار تکثیر سلول‌های سرطان آدنوکارسینومای کولون، گزارش شد که AKG از تکثیر رده‌های سلولی آدنوکارسینوم کولون جلوگیری می‌کند (۱۹). علاوه بر این، AKG چرخه سلولی را تحت تأثیر قرار داد و بیان بازدارنده‌های کینازهای وابسته به سیکلین p21 و Waf1/Cip1 و p27 Kip1 را افزایش داده و همچنین بیان سیکلین D1 مورد نیاز در انتقال G1/S را کاهش می‌دهد که با افزایش قابل توجه تعداد سلول در فاز G1 همراه است. آن‌ها عنوان کردند که AKG یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی چرخه سلولی، پروتئین رتینوبلاستوما (Rb: Retinoblastoma Protein) را تحت تأثیر قرار داده و وضعیت فعال‌سازی آن را کاهش می‌دهد (۱۶). طبق پژوهش انجام شده، غلظت‌های انتخابی ۱۲۰ میکرومولار با زیستایی ۶۰ درصد انتخاب شده همانند تحقیق روی سرطان کولون زیستایی ۵۰-۶۰ درصد داشت و غلظت تیمار ۶۰ میکرومولار با زیستایی ۸۰ درصد همانند تحقیق سرطان کولون که از نظر آماری در یک رده از سرطان کولون معنی‌دار نبود نیز در این پژوهش معنی‌دار نبود (۱۹). Tran و همکاران نشان دادند که محدودیت محیطی گلوتامین، سیگنال‌های Wnt را در

نتایج این مطالعه روی سرطان پستان و پژوهش حاضر نشان می‌دهد که AKG باعث کاهش تعداد کلونی‌های سرطانی می‌گردد. در این بررسی روند ایجاد خراش به منظور ارزیابی مهاجرت انجام گردید. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های OVCAR-3 باعث مهار مهاجرت نسبت به گروه کنترل به میزان معنی‌داری می‌شود. مطالعه انجام شده روی سرطان استخوان نیز نشان می‌دهد که AKG قادر به تنظیم بیان پروتئین‌های مرتبط با چرخه سلولی و توقف پیشرفت چرخه سلولی در فاز G1 بوده و منجر به مهار تکثیر سلولی می‌گردد (۱۰). همچنین این محققین پیشنهاد کردند که فعال‌سازی مسیر (JNK (c-Jun N-terminal Kinase ناشی از AKG و فعال‌سازی کاسپاز ۳ و ۹ می‌تواند منجر به القا آپوپتوز در سلول‌های OS شود. مهار مسیر ERK توسط AKG نیز ممکن است در آپوپتوز دخیل باشد. پتانسیل ضد متاستاتیک AKG با مهار تحرک سلول‌های OS مرتبط است. پتانسیل ضد استئوسارکوم AKG به تأثیر مهاری آن بر تولید و آزادسازی سیتوکین‌هایی مانند $TGF-\beta$ پیش‌متاستازی و VEGF پیش‌رگ‌زایی نسبت داده شد (۱۰). با اینکه در این مطالعه مکانیزم سلولی و مولکولی که بواسطه آن AKG تأثیر خود را بر سلول‌های سرطان تخمدان اعمال می‌کند مورد بررسی قرار نگرفت، اما بنظر می‌رسد AKG از طریق یک یا چند مکانیزم گزارش شده در سایر سلول‌ها، عملکرد کنترلی خود را در سرطان تخمدان ایفا کند. احتمالاً AKG از طریق کنترل چرخه سلولی بواسطه تنظیم سطح پروتئین سیکلین D1 و فسفوریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما (Rb) تکثیر سلول‌های سرطان تخمدان را تنظیم می‌کند. همچنین به نظر می‌رسد که این ترکیب از طریق القاء آپاپتوز و القا تمایز می‌تواند باعث مهار رشد و تکثیر سرطان تخمدان شود.

سیکلین D1 و افزایش بیان پروتئین p21Waf1/Cip1 در سلول‌های Saos-2 همراه بود. علاوه بر این، AKG آپوپتوز و فعال شدن کاسپاز-۳ در هر دو رده سلولی OS را ایجاد کرد. به نظر می‌رسد که آپوپتوز ناشی از AKG عمدتاً از طریق فعال‌سازی یک مسیر آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۹ انجام می‌شود. فرآیند آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار با AKG از طریق فعال‌سازی پروتئین کیناز N ترمینال انجام شد. علاوه بر این، تیمار AKG منجر به کاهش فعال‌سازی کیناز تنظیم‌شده با پیام‌رسانی خارج سلولی و مهار قابل توجه مهاجرت و تهاجم سلولی در شرایط آزمایشگاهی همزمان با کاهش تولید $TGF-\beta$ نیز شد. در نتیجه، پتانسیل ضد استئوسارکوم AKG را نشان دادند (۱۰). مشخص شده است که AKG در آپوپتوز سلولی که توسط p53 تنظیم می‌شود، نقش دارد (۶). P53 فعال می‌تواند آپوپتوز را افزایش دهد. تفاوت در متابولیسم انرژی می‌تواند بر سلول در پاسخ به p53 فعال تأثیر بگذارد. نتایج بررسی کلونی‌زایی نشان می‌دهد که افزایش غلظت تیمار با AKG باعث کاهش کلونی می‌گردد. در مطالعه روی سرطان سینه عنوان گردید که مهار TKT به وسیله AKG می‌تواند منجر به کاهش قابل توجه تعداد کلونی‌ها در سلول‌های رده MCF-7 گردد که نتایج آن‌ها منطبق بر نتیجه ارزیابی کلونی‌زایی پژوهش حاضر در غلظت ۱۲۰ میکرومولار AKG می‌باشد (۲۳). Atlante و همکاران اثر مهارکننده آلفاکتوگلوکوتارات دِهیدروژناز (α -KGDH: Alpha-ketoglutarate dehydrogenase)، با نام AA6، را در موش مدل سرطان پستان رده 4T1 و در سایر رده‌های سلولی سرطان پستان انسانی ارزیابی کردند (۲). در همه شرایط، AA6 چرخه کربس را به گونه‌ای تغییر داد که باعث تجمع AKG درون سلولی شد و نشان داده شد که تیمار با این ماده منجر به کاهش کلونی‌زایی، رشد و مهاجرت این سلول‌ها می‌گردد.

and OGDH, determine autophagy and cell fate/apoptosis in response to Nutlin-3a. *Cancer Biology and Therapy*, 20(3):252-260.

7. Greilberger J., Herwig R., Greilberger M., Stiegler P., Wintersteiger R. 2021. Alpha-Ketoglutarate and 5-HMF: A potential anti-tumoral combination against leukemia cells. *Antioxidants*, 10(11): p.1804.

8. Hamilton T.C., Young R.C., McKoy W.M., Grotzinger K.R., Green J.A., Chu E.W., Whang-Peng J., Rogan A.M., Green W.R., Ozols R.F. 1983. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Research*, 43(11):5379-5389.

9. Harrison A.P., Pierzynowski S.G. 2008. Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art-review article. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(Suppl 1):91-106.

10. Kaławaj K., Sławińska-Brych A., Mizerska-Kowalska M., Żurek A., Bojarska-Junak A., Kandefor-Szerszeń M., Zdzińska B. 2020. Alpha ketoglutarate exerts in vitro anti-osteosarcoma effects through inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis via the JNK and Caspase 9-Dependent mechanism, and suppression of TGF- β and VEGF production and metastatic potential of cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24):9406.

11. Katewa S.D., Kapahi P. 2011. Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 46(5):382-390.

12. Long L.H., Halliwell B. 2011. Artefacts in cell culture: α -Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated

نتیجه‌گیری

در ارزیابی‌های صورت‌گرفته، نشان داده شد که تیمار سلول‌های OVCAR-3 با ماده AKG میزان زیستایی، تکثیر سلولی، رشد و نیز مهاجرت سلولی را به روش وابسته به غلظت کاهش می‌دهد. احتمالاً AKG می‌تواند همراه با داروهای دیگر به‌عنوان یک رویکرد درمانی در درمان سرطان تخمدان استفاده شود. هرچند به مطالعات بیشتر نیاز دارد.

منابع

1. Anand P., Kunnumakara A.B., Sundaram C., Harikumar K.B., Tharakan S.T., Lai O.S., Sung B., Aggarwal B.B., 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25: 2097-2116.
2. Atlante S., Visintin A., Marini E., Savoia M., Dianzani C., Giorgis M., Sürün D., Maione F., Schnütgen F., Farsetti A., Zeiher A.M. 2018. α -ketoglutarate dehydrogenase inhibition counteracts breast cancer-associated lung metastasis. *Cell Death and Disease*, 9(7):756.
3. Bast Jr R.C., Hennessey B. Mills G.B. 2009. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews Cancer*, 9(6):415-428.
4. Bradbury A., O'Donnell R., Drew Y., Curtin N.J., Sharma Saha S. 2020. Characterisation of ovarian cancer cell line NIH-OVCAR3 and implications of genomic, transcriptomic, proteomic and functional DNA damage response biomarkers for therapeutic targeting. *Cancers*, 12(7):1939.
5. Cheng Z.G., Zhang G.D., Shi P.Q., Du B.S. 2013. Expression and antioxidation of Nrf2/ARE pathway in traumatic brain injury. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(4):305-310.
6. Duan L., Perez R.E., Maki C.G. 2019. Alpha ketoglutarate levels, regulated by p53

19. Rzeski W., Walczak K., Juszczak M., Langner E., Pożarowski P., Kandeferszerszeń M., Pierzynowski S.G. 2012. Alpha-ketoglutarate (AKG) inhibits proliferation of colon adenocarcinoma cells in normoxic conditions. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47(5):565-571.
20. Sam Daliri F., Talkhabi M., Toolabi N., Attari F., Kehtari M. 2023. Investigation of the Effect of Conditioned Media of Mesenchymal Stem Cells Treated with Ascorbic Acid on Proliferative Behavior of Breast Cancer Cells. *Journal of Animal Biology*, 15(2):233-245.
21. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F., 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3):209-249.
22. Tran T.Q., Hanse E.A., Habowski A.N., Li H., Ishak Gabra M.B., Yang Y., Lowman X.H., Ooi A.M., Liao S.Y., Edwards R.A. and Waterman, M.L., 2020. α -Ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer. *Nature Cancer*, 1(3):345-358.
23. Tseng C.W., Kuo W.H., Chan S.H., Chan H.L., Chang K.J. and Wang L.H., 2018. Transketolase regulates the metabolic switch to control breast cancer cell metastasis via the α -ketoglutarate signaling pathway. *Cancer Research*, 78(11):2799-2812.
24. Vaisman N., Arber N., 2002. The role of nutrition and chemoprevention in colorectal cancer: from observations to expectations. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 16(2):201-217.
- by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(1):20-24.
13. Maryam B., Fatemeh S., Nourossadat K., Saeideh N., Giti O. 2022. Women's awareness of ovarian cancer risk factors and symptoms in Western Iran in 2020–2021. *BMC Women's Health*, 22(1):192.
14. Matsumoto K., Imagawa S., Obara N., Suzuki N., Takahashi S., Nagasawa T., Yamamoto, M., 2006. 2-oxoglutarate downregulates expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin through decreasing hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 209(2):333-340.
15. McLemore M.R., Miaskowski C., Aouizerat B.E., Chen L.M., Dodd M.J. 2009. Epidemiologic and genetic factors associated with ovarian cancer. *Cancer Nursing*, 32(4):281.
16. Meeran S.M., Katiyar, S.K. 2008. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 13:2191.
17. Naeini S.H., Mavaddatiyan L., Kalkhoran Z.R., Taherkhani S., Talkhabi M. 2023. Alpha-ketoglutarate as a potent regulator for lifespan and healthspan: Evidences and perspectives. *Experimental Gerontology*, 175:112154.
18. Rebbeck T.R., Kauff N.D., Domchek S.M. 2009. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(2):80-87.

Investigating the Effect of Alpha-ketoglutarate on Survival and Proliferation of Ovarian Cancer Cells

Hossein Beiranvand¹, Mahmood Talkhabi^{1*}, Monireh Mahmoodi², Ghamartaj Hossein³

1. Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 384817758, Iran.
3. Developmental Biology Laboratory, Department of Animal Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Ovarian cancer is the third most common cancer in women. Recent studies have shown that Alpha-ketoglutarate (AKG) has an important therapeutic role in heart and nervous diseases and cancers. In the current study, ovarian cancer cells (OVCAR-3 cell line) were obtained from the University of Tehran at the second passage, and cultured in a complete culture medium (1640 RPMI medium containing 10% FBS and 1% penicillin / streptomycin antibiotic). MTT technique was used to evaluate cellular viability. Also, the doubling time of cell population, colony formation and migration of cells were investigated using appropriate methods. MTT assay showed that treatment of cells with AKG decreases viability in a concentration-dependent manner. Based on the MTT assay results, 120 and 60 μM AKG were selected for the next experiments. Evaluation of population doubling time showed that both used concentrations significantly reduce cell growth ($P < 0.05$). Colony forming assay showed that 120 and 60 μM of AKG caused a significant decrease in the number of OVCAR-3 colonies ($P < 0.01$). The study of cell migration showed that the treatment of cells with the mentioned concentrations significantly reduces the migration of cells to the scratch area ($P < 0.01$). The results obtained from this study show that AKG reduces the viability of ovarian cancer cells and has anti-proliferative and anti-migratory effects for this cancer cells. It seems that the use of AKG along with other existing treatments can become a helpful approach for better control and treatment of ovarian cancer.

Keywords: Ovarian cancer, OVCAR-3 cell line, Alpha-ketoglutarate, Viability, Colonization, Migration