

Paper Type: Original Article



## Investigating the effect of Alpha-ketoglutarate on the proliferation behavior of breast cancer cells in vitro

Zahra Rashid Kalkhoran<sup>1</sup>, Mahmood Talkhabi<sup>\*1</sup> , Vahid Azizi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran;\*(Assistant Professor: Corresponding author: [m\\_talkhabi@sbu.ac.ir](mailto:m_talkhabi@sbu.ac.ir)).

### Citation:

Rashid Kalkhoran, Z., Talkhabi, M., & Azizi, V. (2024). Investigating the effect of Alpha-ketoglutarate on the proliferation behavior of breast cancer cells in vitro. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 2), PP. 27-36.

Received: 2023.10.31

Accepted: 2024.01.28

### Abstract

**Introduction:** Breast cancer is the most common type of cancer among women in the world. Research is ongoing to find new and less risky ways to treat breast cancer. Recent studies on the effect of Alpha-ketoglutarate (AKG) on various cancers have shown its inhibitory effect on some cancers. Here, the effect of AKG on the proliferation and migration of 4T1 breast cancer cells was investigated.

**Methods:** 4T1 cells were treated with different concentrations of AKG, the cell viability was calculated using the MTT test, and 160  $\mu$ M of AKG was selected. 4T1 cells were cultured in the presence and absence 160  $\mu$ M AKG, and the growth of 4T1 cells, population doubling time, colony forming potential, cell cycle profile and cell migration rate were investigated.

**Results:** The results showed that AKG reduces the growth of 4T1 cells and increases the population doubling time in the treatment group compared to the control group. Also, AKG decreased the colony forming potential of 4T1 cells (in terms of colony number and size). AKG caused changes in the cell cycle profile in the treatment group, and the results of the scratch repair test also showed the effects of AKG in reducing the ability of cell migration in the treatment group compared to the control.

**Conclusion:** The results of this study showed that AKG can reduce the survival and proliferation of breast cancer cells. It seems that the use of AKG along with other available treatments can help to control and treat breast cancer.

**Keywords:** Alpha-ketoglutarate, Cell cycle, Colony formation, Scratch assay, 4T1 cell line





## تأثیر آلفاکتوگلو تارات بر رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان در شرایط آزمایشگاهی

زهرا رشید کلخوران<sup>۱</sup>، محمود تلخایی<sup>۲\*</sup>، وحید عزیزی<sup>۳</sup><sup>۱</sup>دانشجوی دکتری، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.<sup>۲</sup>استادیار، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.\*نویسنده مسئول: [m\\_talkhabi@sbu.ac.ir](mailto:m_talkhabi@sbu.ac.ir)<sup>۳</sup>استادیار، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۱

## چکیده

**مقدمه:** سرطان پستان، شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان جهان است. تحقیقات برای یافتن روش‌های جدید و کم‌خطر برای درمان سرطان پستان در حال انجام است. بررسی‌های اخیر درباره‌ی اثر آلفاکتوگلو تارات (AKG) بر سرطان‌های مختلف نشان‌دهنده‌ی اثرات مثبت آن در کاهش رشد تومورهای سرطانی بوده‌است. در این مطالعه تأثیر AKG بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 بررسی شد.

**روش‌ها:** سلول‌های 4T1 با غلظت‌های مختلف از AKG تیمار شدند و میزان زیستایی سلول‌ها با استفاده از تست MTT محاسبه و غلظت ۱۶۰ میکرومولار انتخاب گردید. سلول‌های 4T1 در دو گروه تیمار با غلظت ۱۶۰ و کنترل کشت داده شدند و رشد سلول‌های 4T1، زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی، پتانسیل کلونی‌زایی، پروفایل چرخه‌ی سلولی و میزان مهاجرت سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل نشان داد که AKG باعث کاهش رشد سلول‌های 4T1 شده و زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل را افزایش می‌دهد. همچنین AKG توانایی کلونی‌زایی سلول‌های 4T1 (از لحاظ تعداد و سایز کلونی) را کاهش داد. AKG باعث تغییراتی در پروفایل چرخه‌ی سلولی در گروه تیمار شد و نتایج تست ترمیم خراش نیز نشان‌دهنده‌ی اثرات AKG در کاهش توانایی مهاجرت سلولی در گروه تیمار به نسبت کنترل بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که AKG می‌تواند باعث کاهش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های سرطان پستان شود. به نظر می‌رسد که استفاده از AKG در کنار سایر روش‌های درمانی موجود، می‌تواند به کنترل و درمان سرطان پستان کمک کند.

کلیدواژه‌ها: آلفاکتوگلو تارات، ترمیم خراش، چرخه‌ی سلولی، رده‌ی سلولی 4T1، کلونی‌زایی

## مقدمه

سرطان، از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در جهان است که بر اساس آمار سازمان جهانی بهداشت (WHO (World Health Organization) سرطان پستان دومین عامل مرگ و میر زنان در جهان و شایع‌ترین سرطان بین زنان در ایران است [1]. اصلی‌ترین علل ابتلا به این بیماری شامل سابقه‌ی ابتلا به سرطان پستان در خانواده خصوصاً در مادر فرد، بالا رفتن سن، چاقی، زیاده‌روی در مصرف الکل، بالا بودن سن اولین بارداری و شیردهی و مصرف دخانیات می‌شود. همچنین جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 بطور چشمگیری باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان می‌شود [2]، [3]. علائمی مثل تغییر در سایز پستان، تغییر در شکل و ظاهر پستان، فرورفتگی یا برجستگی در بافت پستان، قرمزی، تورم، درد، ترشحات رنگی و یا خونی از نوک پستان از شایع‌ترین علائم ابتلا به سرطان پستان هستند [4]. درمان سرطان پستان با توجه به انواع و مراحل مختلف سرطان پستان بعد از آزمایش‌های ایمونو-هیستوشیمیایی، انجام تست پاتولوژی روی نمونه‌های بافتی و رادیوتراپی انجام می‌شود [5]، [6].

تاکنون داروها و متابولیت‌های مختلفی برای کنترل و درمان سرطان‌ها و بویژه سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته‌اند [7]. داروهای رایج در درمان سرطان پستان شامل دوستاکسل، پاکلیتاکسل، دوکسوروبیسین، اپی‌روبیسین، کاپسیتابین و سیس‌پلاتین است. تمام این داروها شیمیایی بوده و در کنار اثرات مثبت می‌تواند دارای اثرات جانبی شناخته شده و ناشناخته مضر باشد [8]. امروزه شناسایی ترکیباتی با منشأ طبیعی و دارای اثرات ضد سرطانی اهمیت زیادی پیدا کرده است. آلفاکتوگلو تارات (AKG) یکی از ترکیبات مهمی است که در بسیاری از سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است و امروزه تحقیقات زیادی بر پی بردن به نقش و مکانسیم عملکرد آن در سرطان‌های مختلف در حال انجام است. AKG یک کتواسید و واسطه‌ی مهم در چرخه‌ی کربس است و نقش مهمی در فرایندهای سوخت و ساز، اکسیداسیون آمینواسیدها، گلوکز و اسیدهای چرب دارد و از این طریق انرژی لازم برای فعالیت سلول‌های بدن را فراهم می‌کند [9]. AKG به‌عنوان پیش‌ساز اصلی گلوتامین و گلوتامات که به‌عنوان سوخت اصلی سلول‌های روده و سایر سلول‌های بدن در مواقع تنش و استرس است، نقش بسزایی به‌عنوان منبع انرژی مهم برای سلول‌های بدن دارد [10]. بررسی‌های اخیر بر سرطان کولون نشان داده‌است که گلوتامین و AKG در مکانسیم تمایز سلول‌های سرطانی از طریق متعادل سازی مسیر Wnt نقش داشته‌اند و از افزایش تقسیم سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند و همچنین AKG تمایز نهایی سلول‌های سرطانی را تسهیل کرد [11]. همچنین گزارش شده است که تجمع AKG در سلول‌های موش‌های تیمار شده، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های اپی‌ژنتیکی می‌شود و از تبدیل اپی‌تلیال به مزانشیم (Epithelial-mesenchymal transition) EMT و متاستاز جلوگیری کرده و از این طریق در کاهش سرطان نقش دارد [12]. مطالعات نشان دادند که اثر AKG بر سلول‌های هپاتوما از رگ‌زایی و پیشرفت تومورزایی سرطان جلوگیری می‌کند. AKG با افزایش بیان مهارکننده‌های کیناز وابسته به سیکلین در چرخه‌ی سلولی از تقسیم و رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند [13]. AKG همچنین با تاثیر بر رتینوبلاستوما (Retinoblastoma; Rb) باعث کاهش فعالیت آن شده و منجر به توقف چرخه‌ی سلولی در مرحله‌ی G1 و S چرخه‌ی سلولی و عدم رشد سلول‌های سرطانی می‌شود. AKG از طریق تاثیر بر GPR99 و شرکت در مسیر پیام‌رسانی دی‌اکسیژناز وابسته به AKG، می‌تواند بعنوان سرکوبگر تومور در سرطان کولون عمل کند [11].

با توجه به اثرات مثبت AKG بر پیشگیری و درمان انواع سرطان، در این مطالعه فرض شد که AKG بر رفتار تکثیری و مهاجرتی سلول‌های سرطان پستان نیز تاثیر مهمی داشته باشد. به این منظور، در این مطالعه اثرات این ماده بر تکثیر، کلونی‌زایی، زیستایی، پروفایل چرخه سلول و مهاجرت سلول‌های سرطان پستان - رده 4T1 مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## کشت سلول‌های 4T1 و تعیین غلظت با استفاده از MTT

در ابتدا سلول‌های 4T1 در گروه زیست‌شناسی دانشگاه تهران تهیه شد. سلول‌ها با استفاده از محیط RPMI (Gibco) شامل ۱۰ درصد FBS (DNA biotech) و ۱ درصد Pen-strep (DNA biotech) کشت شدند و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 در انکوباتور (Astec) نگهداری شدند. برای پیدا کردن غلظت مناسب از AKG (Sigma Aldrich) برای بررسی بر سلول‌های

4T1، ابتدا تعداد ۵۰۰۰ سلول 4T1 در هر چاهک پلیت ۹۶ تایی کشت داده شد. سپس بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از AKG شامل ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰، ۲۰۰، ۲۲۰ میکرومولار و یک گروه کنترل، هر کدام با دو تکرار تیمار شدند. این غلظت‌ها بر اساس غلظت مورد استفاده‌ی AKG در مطالعات قبلی بر روی اثرات AKG بر سرطان‌های مختلف انتخاب شدند [14]، [15]. پس از ۲۴ ساعت ابتدا محیط رویی سلول‌ها خارج شد و با محلول PBS (DNA biotech) شسته شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma Aldrich) به هر خانه از پلیت اضافه شد تا غلظت نهایی MTT در چاهک‌ها ۰/۵ mg/mL شود. بعد از گذشت حداقل ۲ ساعت از نگهداری در انکوباتور، محیط رویی حاوی MTT خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (DNA biotech) به هر چاهک پلیت اضافه شد. در نهایت پس از چند دقیقه جذب سلول‌های هر گروه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزاریدر (Biotek) خوانش شد.

### بررسی توانایی کلونی‌زایی

برای انجام این بررسی ابتدا تعداد ۲۰۰ سلول 4T1 در هر چاهک یک پلیت ۶ تایی کشت داده شدند و بطور روزانه وضعیت سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس (ZEISS) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از اتصال سلول‌ها به کف چاهک‌ها و شروع شکل‌گیری کلونی، سلول‌ها در دو گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۶۰ میکرومولار AKG تقسیم شدند و بطور روزانه محیط کشت چاهک‌ها تعویض و تیمار تکرار شد. بعد از ۸ روز وضعیت کلونی‌ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شد و بعد از خارج کردن محیط چاهک‌ها، محلول فرمالین ۱۰ درصد که برای ثابت کردن کلونی‌ها در سطح پلیت استفاده می‌شود، اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه، رنگ کریستال ویوله به چاهک‌ها اضافه شد بعد از شست‌وشو با آب، نهایتاً توسط میکروسکوپ معکوس سائز کلونی‌ها بررسی شد و تعداد کلونی‌ها شمارش و ثبت شد.

### ترسیم منحنی رشد

برای بررسی روند رشد سلول‌های 4T1 ابتدا تعداد ۳۰ هزار سلول در هر چاهک از پلیت ۱۲ تایی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت چاهک‌ها به دو گروه کنترل و تیمار تقسیم شدند و با غلظت ۱۶۰ میکرومولار AKG تیمار شدند. در طول مدت ۸ روز، تیمار سلول‌ها و تعویض محیط کشت بطور روزانه انجام شد و چاهک‌ها برای هر روز شمارش مشخص شده و هر روز توسط لام نئوبار شمارش شدند. در نهایت روند رشد سلول‌ها در هر گروه ثبت شد و نمودار رشد آن‌ها رسم و بررسی شد.

### بررسی چرخه‌ی سلولی سلول‌های 4T1 تیمار شده با AKG

برای بررسی پروفایل چرخه‌ی سلولی، ابتدا تعداد ۲۰۰۰ سلول 4T1 را در هر چاهک پلیت کشت سلول ۶ خانه کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور، AKG در محیط جدید حل شده و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت تیمار، سلول‌های هر چاهک توسط آنزیم تریپسین کنده شدند و برای بررسی فازهای مختلف چرخه‌ی سلولی به شرکت بافت آزما (تهران- ایران) ارسال شدند.

### محاسبه‌ی زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت

برای بررسی زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی ابتدا تعداد ۲۰۰ هزار سلول برای هر چاهک پلیت ۶ تایی در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۶۰ میکرومولار کشت داده شد. بمدت ۴ روز بطور روزانه وضعیت سلول‌ها بررسی شد و محیط کشت سلول‌ها تعویض شده و تیمار تکرار شد. بعد از این مدت سلول‌های هر چاهک با لام نئوبار شمارش شد و زمان دو برابر شدن جمعیت سلول‌ها با فرمول ( $\text{Doubling Time} = \ln 2 / [n * \ln (1 + r/n)]$ ) محاسبه شد.

### بررسی مهاجرت سلول‌های 4T1 در شرایط تیمار با AKG با استفاده از ایجاد خراش

برای بررسی روند مهاجرت سلولی در سلول‌های سرطانی 4T1 از تکنیک ایجاد خراش (Scratch assay) استفاده شد. ابتدا تعداد ۲۰۰ هزار سلول 4T1 در یک پلیت ۶ خانه در گروه‌های کنترل و تیمار با غلظت ۱۶۰ میکرومولار کشت داده شدند و بصورت روزانه وضعیت رشد سلول‌ها بررسی شد و در صورت نیاز تعویض محیط و تیمار انجام شد. بعد از اینکه سلول‌ها رشد کردند و کف چاهک‌ها را تقریباً ۹۰ درصد پر کردند، با استفاده از یک تیپ کریستال در قسمت وسط تمام چاهک‌ها یک شیار مستقیم و یکسان ایجاد شد. در مرحله‌ی بعد برای توقف رشد در تمامی گروه‌های سلول‌ها از غلظت ۰/۵ mg/mL میتوماپسین (India-Accord) استفاده شد و بعد

از گذشت ۲۴ ساعت، چاهکها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شدند و برای مقایسه‌ی روند مهاجرت سلولی در گروه تیمار در مقایسه با کنترل، توسط دوربین عکسبرداری شدند.

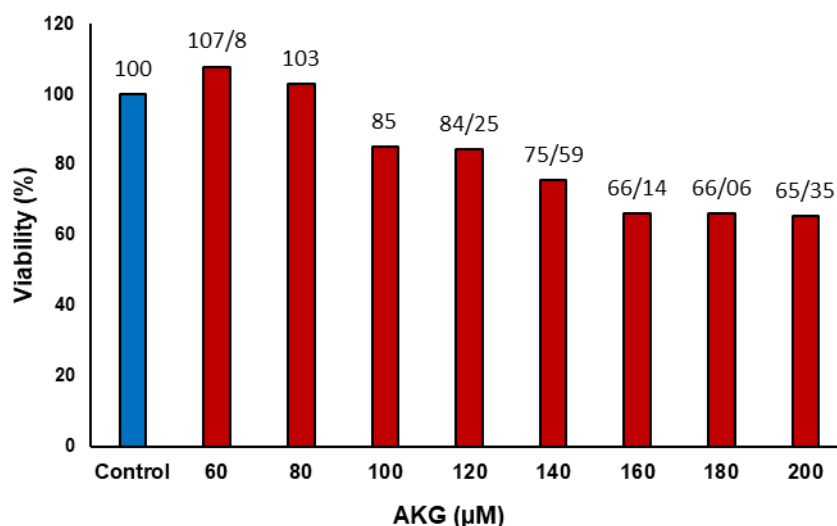
## آنالیز آماری

تمامی ارزیابی مطالعه حاضر با دو تکرار زیستی انجام شدند. تمام نمودارها براساس نتایج حاصل از میانگین دو تکرار زیستی و با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 9 رسم شدند.

## نتایج و بحث

### زنده‌مانی سلول‌های 4T1 با استفاده از سنجش MTT

بررسی نتایج تست MTT نشان داد که در غلظت ۱۶۰ میکرومولار میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۶۶.۱۴ درصد بود که این نسبت به گروه کنترل کاهش ۳۴ درصدی داشت (شکل ۱). میزان زنده‌مانی در غلظت ۱۶۰ و بالاتر از آن کمترین میزان زنده‌مانی سلول‌ها را نشان می‌دهد و بعلاوه تفاوت ناچیز بین آن‌ها، غلظت ۱۶۰ انتخاب شد و در سایر بررسی‌ها بعنوان غلظت کاهنده‌ی زنده‌مانی سلول‌های 4T1 استفاده شد.



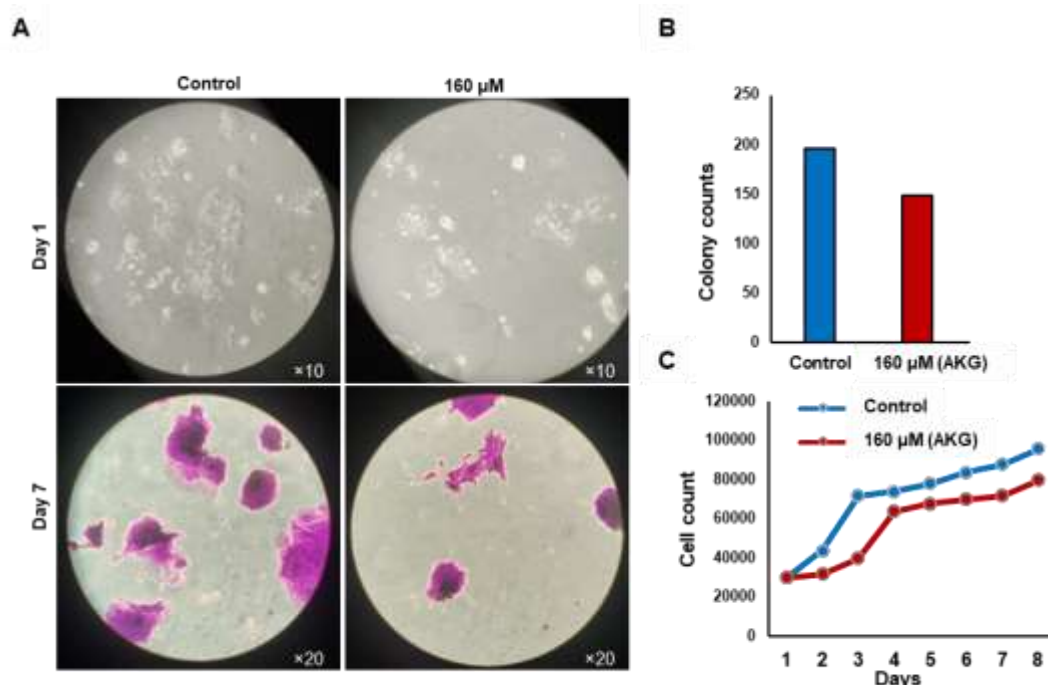
شکل ۱- بررسی زنده‌مانی سلول‌های 4T1 تیمار شده با استفاده از روش سنجش MTT. نمودار براساس میانگین دو تکرار برای هر غلظت است  
Figure 1- Analysis of viability of AKG treated 4T1 cells using MTT assay, (n=2)

## بررسی کلونی‌زایی

بعد از گذشت هفت روز از تیمار و رنگ آمیزی با کریستال ویوله، کلونی‌های سلولی بصورت چشمی و نیز با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند که نشان دهنده اندازه کوچکتر کلونی‌ها در گروه تیمار نسبت به کنترل بود (شکل ۲-A). همچنین شمارش تعداد کلونی‌ها در هر گروه نشان داد که گروه کنترل تعداد ۱۹۰ کلونی و گروه تیمار با غلظت ۱۶۰ میکرومولار تعداد ۱۵۵ کلونی داشتند (شکل ۲-B). این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی تاثیر AKG بر کاهش توانایی کلونی‌زایی سلول‌های سرطانی رده‌ی 4T1 در سائز و تعداد را دارند.

## ترسیم منحنی رشد

پس از شمارش روزانه سلول‌ها و ثبت نتایج میانگین از دو تکرار تست برای هر غلظت، ترسیم منحنی رشد نشان داد که تیمار با AKG میزان رشد سلول‌ها را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده‌است. بر این اساس تعداد سلول‌های هر دو گروه تیمار و کنترل مورد شمارش روزانه قرار گرفتند. هرچند مشاهده می‌شد که تعداد سلول‌ها در روزهای متوالی نسبت به تعداد اولیه سلول افزایش دارد اما در تمام روزهای بررسی، تعداد سلول‌های گروه تیمار کمتر از گروه کنترل بود که نشان دهنده سرعت تکثیر پایین‌تر سلول‌ها در حضور AKG بود (شکل ۲-۲). همچنین نمودار منحنی رشد، کاهش رشد بعد از ۳ و ۴ روز به ترتیب برای سلول‌ها در گروه کنترل و گروه تیمار نشان داد که نزدیک شدن سلول‌ها به فاز ایستایی را نشان می‌دهد.



شکل ۲-۲) مورفولوژی کلونی‌های سلول‌های 4T1 در گروه کنترل و تیمار قبل و بعد از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله، (B) تعداد کلونی سلول‌های 4T1 در گروه کنترل و تیمار شده با غلظت ۱۶۰ میکرومولار AKG. نتایج حاصل از میانگین دو تکرار است، (C) منحنی رشد سلول‌های 4T1 در گروه‌های کنترل و تیمار شده با غلظت ۱۶۰ میکرومولار از AKG. نتایج میانگین دو تکرار برای هر گروه است

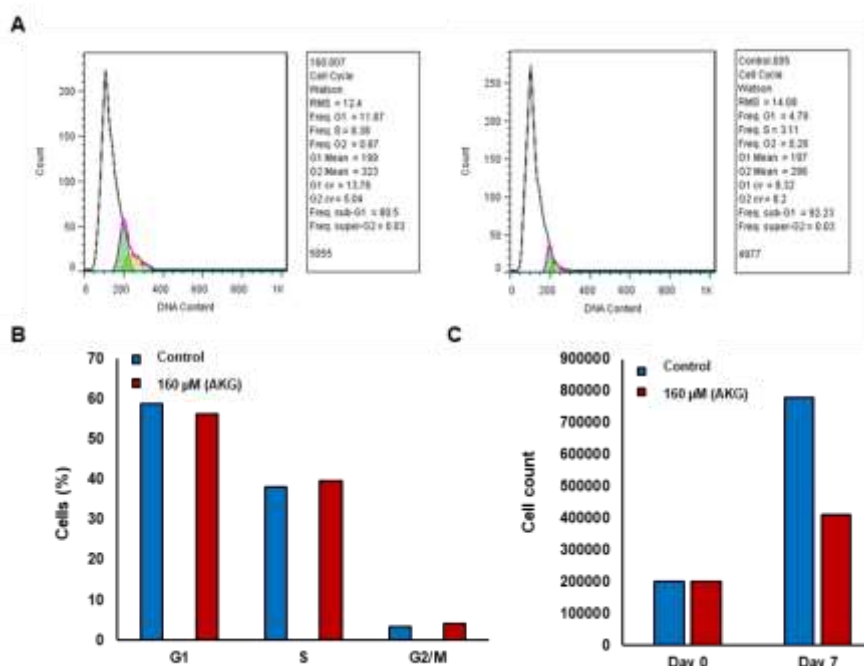
Figure 2- A) Morphology of colonies of 4T1 cells in the control and treatment group, before and after staining with crystal violet, B) The number of colonies of 4T1 cells in the control and treated with 160 μM AKG, (n=2). C) Growth curve of 4T1 cells in the control and 160 μM AKG treated group, (n=2)

## بررسی چرخه‌ی سلولی در سلول‌های 4T1 تیمار شده با AKG با تکنیک فلوسایتومتری

در بررسی چرخه‌ی سلول‌های 4T1، نسبت سلول‌ها در مراحل مختلف سلولی G1، S و G2 بصورت درصد نشان داده شد (شکل ۳-۲). بررسی نتایج پروفایل چرخه‌ی سلولی نشان داد که بیشترین درصد سلول‌ها در فاز S و G2 در گروه تیمار با غلظت ۱۶۰ میکرومولار متوقف شده‌اند در صورتی که درصد بیشتری از سلول‌ها در گروه کنترل در فاز G1 بودند (شکل ۳-۲).

## بررسی زمان دو برابر شدن جمعیت سلول‌های 4T1

محاسبه‌ی زمان دو برابر شدن جمعیت سلول‌های 4T1 در گروه کنترل و تیمار نشان داد که سلول‌ها در گروه کنترل به نسبت گروه تیمار سریع‌تر رشد کرده و تعدادشان دو برابر شده‌است. زمان دو برابر شدن سلول‌های گروه کنترل ۵۲ ساعت و در گروه تیمار با غلظت ۱۶۰ میکرومولار ۶۴ ساعت محاسبه شد. بر طبق این یافته‌ها زمان دو برابر شدن در گروه تیمار شده با AKG در مقایسه با گروه کنترل، کاهش می‌یابد و این سلول‌ها زمان بیشتری برای افزایش تعداد سلول‌ها نیاز دارند (شکل ۳-۲).

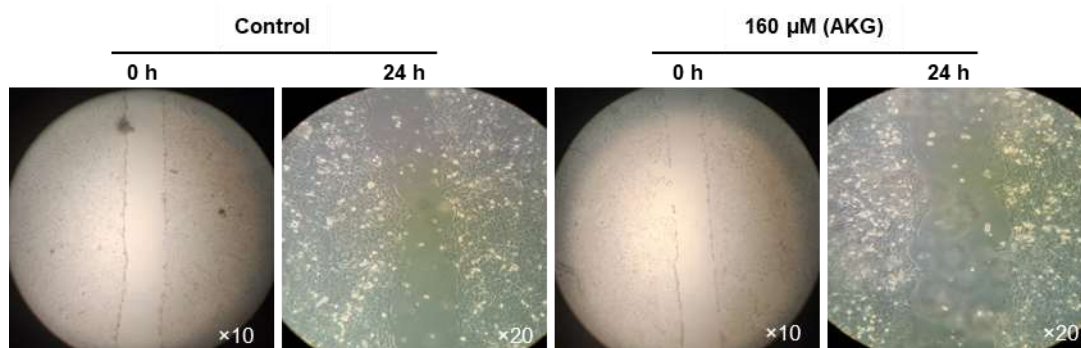


شکل ۳- A و B) نتایج بررسی پروفایل چرخه سلولی سلولهای 4T1 در گروه کنترل و تیمار. داده ها میانگین دو تکرار است. C) زمان دو برابر شدن جمعیت سلولهای 4T1 در گروه کنترل و تیمار شده با AKG. داده ها میانگین دو تکرار است

Figure 3- A and B) The results of analysis of cell cycle profile of 4T1 cells in the control and AKG-treated group (n=2). C-3) The population doubling time of 4T1 cells in the control and AKG treated group (n=2)

### بررسی مهاجرت سلولهای 4T1 در شرایط تیمار با AKG با استفاده از ایجاد خراش

بررسی تصاویر میکروسکوپی از روند ترمیم خراش نشان داد که مهاجرت سلولهای 4T1 تیمار شده با AKG کندتر از گروه کنترل است. بطوریکه پر شدن محل خراش بعد از ۲۴ ساعت، در گروه کنترل نسبت به گروه تیمار با سرعت بیشتری صورت گرفته است و در زمان یکسان، سلولهای گروه تیمار حجم کمتری از خراش را پر کرده اند (شکل ۴). بنابراین AKG باعث کاهش توانایی مهاجرت سلولی یا متاستاز در سلولهای سرطانی شده است.



شکل ۴- بررسی مهاجرت سلولی با استفاده از روش ایجاد خراش. تصویر سلول ها در گروه تیمار شده با غلظت ۱۶۰ میکرومولار AKG (راست) و گروه کنترل (چپ). مهاجرت سلولی در گروه کنترل نسبت به گروه تیمار با سرعت بیشتری انجام گرفته است

Figure 4- Examining the cell migration using scratch assay. Photograph of cells in treated group with 160 μM of AKG (right) and in the control group (left). Cell migration in the control group is higher than the treatment group

سرطان پستان بعنوان شایع ترین سرطان و یکی از اصلی ترین علل مرگ و میر در ایران و جهان به خصوص در زنان، نیازمند بررسی مطالعات بیشتر در ارتباط با یافتن روش درمانی به نسبت کم هزینه تر و موثرتر از سایر روش های رایج مانند رادیوتراپی، جراحی و داروهای شیمیایی است که دارای اثرات جانبی فراوانی نیز هستند. ماده ی AKG بعنوان یک متابولیت طبیعی در چرخه ی کربس سلول های بدن، دارای اثرات متنوعی است که بررسی اثرات مثبت آن در افزایش طول عمر، افزایش پروتئین زایی و تنظیم بیان ژن باعث افزایش اهمیت تحقیق بیشتر این ماده در حوزه ی سرطان شده است [16]، [17]. در مطالعه ی انجام شده جهت بررسی اثر



ماده‌ی AKG بر تومورزایی سرطان پستان در رده‌ی 4T1، ابتدا سلول‌های 4T1 با ماده‌ی AKG بمدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۶۰-۲۰۰ میکرومولار که بر اساس مطالعات اخیر انتخاب شدند، تیمار شدند. سپس با استفاده از سنجش MTT غلظت ۱۶۰ میکرومولار AKG برای تیمار سلول‌ها در تست‌ها انتخاب شد. علت انتخاب این غلظت به این صورت بود که در غلظت ۱۶۰ کاهش ۳۴ درصدی زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به کنترل مشاهده شد و بعنوان غلظت موثر در کاهش رشد سلول‌ها سرطانی 4T1 استفاده شد. در بررسی‌های صورت گرفته در مطالعه‌ی اثر افزایش میزان AKG درون سلولی و فعالیت آنزیم AKG دهیدروژناز، باعث کاهش رشد و تومورزایی در سلول‌های سرطانی از طریق تنظیم اپی‌ژنتیکی آنزیم TET و دمتیلاسیون DNA در رده‌ی MDA-MB-231 که مهاجم‌ترین رده‌ی سلولی سرطان پستان در انسان است، در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی شد [12].

در بررسی زنده‌مانی سلول‌های 4T1 در تیمار با AKG از سنجش MTT استفاده شد که در این تست از بین غلظت‌های مورد مطالعه، در غلظت‌های ۱۶۰ میکرومولار و بالاتر تیمار با AKG باعث روند کاهشی در تعداد و رشد سلول‌های 4T1 شد که این اثر بر اساس مطالعات [18] نیز، تاییدکننده‌ی اثر AKG در غلظت‌های ۰-۲۰۰ میلی‌مولار بر کاهش زنده‌مانی سلول‌ها از طریق تنظیم همانندسازی DNA و متیلاسیون هیستون‌ها است. کمترین تعداد سلول‌ها و رشد سلول‌های 4T1 در غلظت ۱۸۰ میکرومولار AKG بود که رشد سلول‌ها را به ۶۶ درصد کاهش داد. به دلیل ثابت بودن نسبی میزان زنده‌مانی سلول‌ها از غلظت ۱۶۰ به بالاتر، این غلظت بعنوان غلظت کاهنده‌ی زنده‌مانی سلول‌های 4T1 استفاده شد. در بررسی‌های مشابه صورت گرفته، بررسی اثر AKG در غلظت‌های ۰-۲۰۰ میلی‌مولار بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولون رده‌ی caco-2، HT-29 و LS-180 توسط سنجش MTT، باعث کاهش رشد و زنده‌مانی در این رده‌های سلولی شد و این یافته‌ها در بررسی‌های دیگر نیز تایید شد [15]. در بررسی نتایج کلونی‌زایی سلول‌های سرطانی 4T1 از لحاظ سایز و تراکم سلولی در کلونی‌ها، سلول‌های تیمار شده با AKG نسبت به کنترل، کلونی‌های کوچکتری از لحاظ حجم و تعداد تشکیل دادند که این یافته‌ها با مشاهدات و شمارش کلونی‌ها صورت گرفت. بر اساس مطالعات انجام شده در رابطه با کلونی‌زایی سلول‌های سرطان پستان رده‌ی سلولی 4T1 با تیمار با AA6 و AKG نشان داد که AKG در غلظت ۵۰ mM از طریق افزایش میزان نیتریک اکسید (NO) درون سلولی و تنظیم بیان آنزیم TET، از افزایش رشد سلول‌های سرطانی، کلونی‌زایی و متاستاز سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده است [12].

نتایج حاصل از ترسیم منحنی رشد سلول‌های 4T1 در تیمار با AKG نشان داد که تقسیم و رشد سلول‌های 4T1 نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. بر اساس مطالعات انجام شده بر رشد سلول‌های سرطان ریه (رده‌ی سلولی H460) و کولورکتال (رده‌ی سلولی HCT116) در انسان، بررسی اثر دی‌متیل (AKG (DMKG)، که از مشتقات AKG است با سرکوب افزایش تولید گلوکز (گلیکولیز) باعث کاهش رشد و مرگ این سلول‌ها شده است [19]. هم‌چنین در بررسی دیگری درباره‌ی اثر AKG بر سلول‌های سرطانی استئوسارکوما (سرطان استخوان)، تایید شد که AKG باعث تاثیر بر رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های ۲/۵ - ۲۰۰ میلی‌مولار و روند کاهشی در آنها شده است [15]. نتایج این بررسی با تست Brdu برای سنجش میزان همانند سازی DNA و سنجش MTT با غلظت ۲۰۰ mM نیز بررسی شده است که نتایج حاصل از این بررسی نیز روند کاهش همانند سازی DNA و کاهش رشد سلول را تایید می‌کند [20]. هم‌چنین با مقایسه‌ی سرعت رشد سلول‌ها در دو روز اول تیمار با AKG نسبت به باقی روزها در گروه تیمار و کنترل، مشخص است که AKG در روزهای اولیه‌ی تیمار با نسبت بیشتری از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده است و در ادامه به نسبت تقریباً یکسانی با سلول‌های گروه کنترل رشد داشته است. احتمالاً در روزهای ابتدایی تیمار، سمیت ایجاد شده بوسیله AKG باعث جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی شده و زیستایی آنها را کاهش می‌دهد، اما با گذر زمان سلول‌ها با مکانیسم‌هایی مثل تنظیم بیان IFN $\gamma$ -STAT1 و سایر روش‌ها، در برابر اثر مهاری AKG بر رشدشان مقاومت کرده و زیستایی خود را حفظ می‌کنند. علاوه بر این ممکن است جمعیت اولیه سلول‌های همگن نبوده و پاسخ هر سلول در برابر اثر مهاری AKG متفاوت باشد. در نتیجه با وجود کشت در زمان و شرایط یکسان، پاسخ متفاوتی در هر سلول نسبت به تیمار با AKG دیده شود. اخیراً نیز مشخص شده است که AKG کارایی ایمونوتراپی بر علیه سلول‌های سرطان ملانوما را بهبود می‌بخشد [21]. بررسی اثر AKG بر چرخه‌ی سلولی سلول‌های سرطانی 4T1، مشاهدات نشان داد که در غلظت ۱۶۰ میکرومولار توقف در فاز S چرخه‌ی سلولی ایجاد شد که این موضوع با نتایج بررسی‌های اخیر تطابق دارد. AKG در غلظت ۱۰۰ mg/kg در موش‌ها با تنظیم بیان پروتئین‌های تنظیم کننده‌ی چرخه‌ی سلولی مانند سیکلین‌ها و مهار کینازهای وابسته به سیکلین مانند p21Waf1/Cip1، باعث تنظیم انتقال سلول از فاز G1 به S می‌شود. پروتئین p21 نیز بعنوان پروتئین تنظیم‌کننده‌ی پیشرفت چرخه‌ی سلولی در فاز G1، با فسفریله کردن پروتئین Rb و اتصال و مهار سیکلین‌ها، از ورود سلول به فاز تقسیم سلولی جلوگیری می‌کند و سلول در فاز G1 و S متوقف می‌شود [20].

در بررسی روند ترمیم خراش که عموماً برای مطالعه‌ی اثرات مواد مختلف در ترمیم زخم یا مطالعات بررسی متاستاز سرطان انجام می‌شود، نتایج حاصل بیانگر اثر AKG در غلظت 50 mM در کاهش متاستاز در سلول‌های سرطانی 4T1 بود. بطوریکه سلول‌ها در گروه تیمار توانایی ترمیم خراش و مهاجرت سلولی کمتری نسبت به گروه کنترل داشتند. در مطالعه‌ی دیگر [12] درباره‌ی بررسی اثر AKG بر متاستاز سرطان پستان در سلول‌های 4T1 بیان شده است که افزایش غلظت درون سلولی AKG با اثر بر فعالیت آنزیم TET و دمتیلاسیون پروموتور miR-200 باعث افزایش نیتریک اکسید (NO) درون سلولی می‌شود. NO با تعدیل Matrix (MMP metalloproteinases) باعث کاهش متاستاز در تومورهای سرطان پستان می‌شود. البته در برخی موارد بسته به نوع تومور، NO باعث افزایش تهاجم سلول‌های تومور نیز می‌شود [12]. همچنین بررسی مطالعات اخیر [18] در رابطه با اثر AKG بر متاستاز سلول‌های سرطانی استئوسارکوما (استخوان) بیانگر این است که AKG باعث کاهش تهاجم و متاستاز سرطان استئوسارکوما در انسان می‌شود [20]. نتایج این تحقیقات مطابق نتایج حاصل از تست ترمیم خراش انجام شده در این مطالعه بود.

## نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی انجام شده، بررسی تاثیر AKG بر زیستایی و رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان در شرایط آزمایشگاهی انجام شد که ارزیابی‌های صورت گرفته نشان دهنده‌ی این بود که در صورت تیمار سلول‌های سرطان پستان رده‌ی 4T1 با AKG، زیستایی و تکثیر سلول‌های سرطان پستان کاهش می‌یابد. بنابراین از این موضوع می‌توان با تحقیقات بیشتر و بررسی سایر اثرات AKG به‌عنوان یک متابولیت طبیعی بدن برای درمان یا کنترل سرطان پستان استفاده کرد.

## اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچگونه تعارض منافع با شخص یا نهادی ندارند.

## سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد است و در دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است. از کارشناس آزمایشگاه تحقیقات عمومی دانشکده علوم و فناوری زیستی تشکر می‌کنیم.

## منابع

- [1] Bray, F., Ferly, J., Soerjmataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), 394-424.
- [2] Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences* 13 (11), 1387.
- [3] Sharifi, Z., Talkhabi, M., Taleahmad, S. (2022). Identification of potential microRNA diagnostic panels and uncovering regulatory mechanisms in breast cancer pathogenesis. *Scientific Reports* 12 (1), 20135.
- [4] Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., Sharma, K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology and research* 1 (2), 109-126.
- [5] Waks, A. G., Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama* 321 (3), 288-300.
- [6] 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.
- [7] Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., Stanisławek, A. (2021). Breast cancer- epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-an updated review. *Cancers* 13 (17), 4287.
- [8] Masoud, V., Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World journal of clinical oncology* 8 (2), 120-134.
- [9] Zdzisińska, B., Żurek, A., Kandefer-Szerszeń, M. (2017). Alpha-ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 65 (1), 21-36.
- [10] Wu, N., Yang, M., Gaur, U., Xu, H., Yao, Y., Li, D. (2016). Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomolecules & therapeutics* 24 (1), 1-8.
- [11] 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., Waterman, M. L., Kong, M. (2020).  $\alpha$ -Ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer. *Nature cancer* 1 (3), 345-358.

- [12] Atlante, S., Visintin, A., Marini, E., Savoia, M., Dianzani, C., Giorgis, M., Sürün, D., Maione, F., Schnütgen, F., Farsetti, A., Zehir, A. M., Bertinaria M., Giraudo, E., Spallotta, F., Cencioni, C., Gaetano, C. (2018).  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase inhibition counteracts breast cancer-associated lung metastasis. *Cell death & disease* 9 (7), 756.
- [13] Rzeski, W., Walczak, K., Juszcak, M., Langner, E., Pożarowski, P., Kandefer-Szerszeń, 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.
- [14] 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), 1804.
- [15] Abła, H., Sollazzo, M., Gasparre, G., Iommarini, L., Porcelli, A. M. (2020). The multifaceted contribution of  $\alpha$ -ketoglutarate to tumor progression: An opportunity to exploit? *Seminars in cell and developmental biology* 98, 26-33.
- [16] Harrison, A., Tygesen, M. p., Sawa-Wojtanowicz, B., Husted, S., Tatara, M. (2004).  $\alpha$ -Ketoglutarate treatment early in postnatal life improves bone density in lambs at slaughter. *Bone* 35 (1), 204-209.
- [17] Chin, R. M., Fu, X., Pai, M. Y., Vergnes, L., Hwang, H., Deng, G., Diep, S., Lomenick, B., Meli, V. S., Monsalve, G. C., Hu, E., Whelan, S. A., Wang, J. X., Jung, G., Solis, G. M., Fazlollahi, F., Kaweteerawat, C., Quach, A., Nili, M., Krall, A. S., Godwin, H. A., Chang, H. R., Faull, K. F., Guo, F., Jiang, M., Trauger, S. A., Saghatelian, A., Braas, D., Christofk, H. R., Clarke, C. F., Teitell, M. A., Petrascheck, M., Reue, K., Jung, M. E., Frand, A. R., Huang, J. (2014). The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* 510 (7505), 397-401.
- [18] Kaławaj, K., Sławińska-Brych, A., Mizerska-Kowalska, M., Żurek, A., Bojarska-Junak, A., Kandefer-Szerszeń, M., Zdzisińska, 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- $\beta$  and VEGF production and metastatic potential of cells. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24), 9406.
- [19] Hu, X., Liu, Y., Qin, C., Pan, Z., Luo, J., Yu, A., Cheng, Z. (2014). Up-regulated isocitrate dehydrogenase 1 suppresses proliferation, migration and invasion in osteosarcoma: in vitro and in vivo. *Cancer letters* 346 (1), 114-121.
- [20] Sica, V., Bravo-San Pedro, J. M., Izzo, V., Pol, J., Pierredon, S., Enot, D., Durand, S., Bossut, N., Chery, A., Souquere, S., Pierredon, S., Vartholomaiou, E., Zamzami, N., Soussi, T., Sauvat, A., Mondragon, L., Kepp, O., Galluzzi, L., Martinou, J. C., Hess- Stumpp, H., Ziegelbauer, K., Kroemer, G., Maiuri, M. C. (2019). Lethal poisoning of cancer cells by respiratory chain inhibition plus dimethyl  $\alpha$ -ketoglutarate. *Cell reports* 27 (3), 820-834.
- [21] Liu, N., Zhang, J., Yan, M., Chen, L., Wu, J., Tao, Q., Yan, B., Chen, X., Peng, C. (2023). Supplementation with  $\alpha$ -ketoglutarate improved the efficacy of anti-PD1 melanoma treatment through epigenetic modulation of PD-L1. *Cell Death & Disease* 14 (2), 170.