



## Investigating the effect of Alpha-ketoglutarate on the survival and proliferation of ovarian cancer cell line SKOV3

Hairapetian E<sup>a</sup>, Beiranvand H<sup>a</sup>, Mahmoodi M<sup>b</sup>, Hossein G<sup>c</sup>, Talkhabi M<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> Master of Science, Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>b</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, 384817758, Iran

<sup>c</sup> Associate Professor, Developmental Biology Laboratory, Department of Animal Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>d</sup> Assistant Professor, Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Hairapetian E, Beiranvand H, Mahmoodi M, Hossein G, Talkhabi M. Investigating the effect of Alpha-ketoglutarate on the survival and proliferation of ovarian cancer cell line SKOV3. *Journal of Cell and Tissue*. 2024; 15(1):31-44

<https://10.52547/JCT/15.1.31>

### KEYWORDS

Ovarian Cancer,  
Alpha-ketoglutarate,  
Survival,  
Proliferation,  
Apoptosis,  
colonization,  
cell cycle.

### ABSTRACT

**Aim:** Cancer remains a global health problem, with ovarian cancer ranking fifth among cancers affecting women and the leading cause of cancer-related death in women. There are different types of ovarian cancer, including Epithelial ovarian cancer, Stromal tumors and Germ cell tumors. Epithelial ovarian cancer is the most common type that includes several subtypes, including serous carcinoma and mucinous carcinoma. To this end, several factors have been identified to increase your risk of ovarian cancer, including older age, inherited gene changes, family history of ovarian cancer, being overweight or obese, postmenopausal hormone replacement therapy, endometriosis, and never having been pregnant. The current strategies to treat ovarian cancer include surgery, chemotherapy, radiotherapy and targeted therapies, and hormone therapy. Scientists continue to investigate the foundational mechanisms involving cancer development, as well as to find new drugs and metabolites having the capacity to control cancer. Alpha-ketoglutarate (AKG), a critical metabolite in the Krebs cycle involved in cellular energy production and the regulation of gene expression. Recent studies have shown that AKG may have the potential to enhance the efficacy of cancer treatments, by modulating the tumor microenvironment and improving the immune response against cancer cells. This study investigates the effect of AKG on ovarian cancer cells.

\* Corresponding author. Tel.: 02122435909 Fax: 02122431664

E-mail address: m\_talkhabi@sbu.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/15.1.31>

Received: 10 Jun. 2024; Received in revised form: 22 Feb. 2024; Accepted: 4 Mar. 2024

Original Article

© Author



**Material and methods:** SKOV3 cells were obtained from Tehran University and cultured in complete culture medium (RPMI, 10% Fetal bovine serum (FBS), and 1% Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)). To find the proper concentration of AKG, SKOV3 cells were cultured in 96-well plate, and treated with different concentration of AKG (range 20 to 220  $\mu\text{M}$ ). After 24 and 48 h, the viability of the cells was determined using MTT assay. Based on the results obtained from viability assay, 200  $\mu\text{M}$  of AKG was selected for the next assessments. To evaluate the effect of AKG on SKOV3 cell proliferation using plotting a growth curve, cells were cultured in the presence (200  $\mu\text{M}$  AKG) and absence of AKG, and counted the number of cells every 24h for one week. To determine the population doubling time (PDT), the cells were cultured in the presence (200  $\mu\text{M}$  AKG) and absence of AKG for 72h, then the cell were collected and the number of living cells was counted using Neubauer Chamber. The PDT was calculated using a related standard method. To assess colony formation potential, the SKOV3 cell were cultured in the presence (200  $\mu\text{M}$  AKG) and absence of AKG. After 7 days, the cells were fixed using 10% formalin solution, then the colonies were stained using crystal violet dye, and the number of colonies were counted using inverted microscope. To investigate the effect of AKG on the migration rate of SKOV3 cells, the cells were cultured in complete medium to reach 85% confluence, then treated with mitomycin (10  $\mu\text{M}$ ) for 3h, then Created a scratch in the cell monolayer using a sterile pipette tip. the cells were cultured in the presence (200  $\mu\text{M}$  AKG) and absence of AKG for 3 days. The images of the scratch were taken at regular intervals using a microscope, and the closure of the scratch over time was analyzed. To analyze the cell cycle profile, the SKOV3 cell were cultured in the presence (200  $\mu\text{M}$  AKG) and absence of AKG for 48h. Then, the cells were collected and analyzed using a flow cytometry.

**Results:** Based on the MTT assay, 200  $\mu\text{M}$  AKG was determined as the proper concentration to investigate other biological behaviors of SKOV3 cells. Colony forming assay showed a decrease in the number and size of colonies in the AKG-treated group ( $P < 0.05$ ). In addition, the cell doubling time increased in the treatment group, indicating slower growth rate ( $P < 0.05$ ). Growth curve analysis confirmed reduced cell growth in treated group. Cell cycle analysis showed a higher percentage of treated cells arrested in S and G1 phases. The scratch assay showed slow cell migration and metastasis in the cells treated with 200  $\mu\text{M}$  AKG.

**Conclusion:** In conclusion, AKG has an inhibitory effect on the proliferation, viability, migration in SKOV3 ovarian cancer cells, highlighting its potential as an adjuvant treatment with existing therapies. More research is necessary to fully investigate the therapeutic effect of AKG in ovarian cancer.



## بررسی اثر آلفاکتوگلو تارات بر زیستایی و تکثیر سلول‌های رده SKOV3 سرطان تخمدان

ادرین هایراپتیان<sup>۱</sup>، حسین بیرانوند<sup>۱</sup>، منیره محمودی<sup>۲</sup>، قمرتاج حسین<sup>۳</sup>، محمود تلخابی<sup>۴\*</sup>

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران  
 ۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران  
 ۳- دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
 ۴- استادیار، گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
سرطان تخمدان، آلفاکتوگلو تارات، زیستایی، تکثیر، آپوپتوز، کلونی زایی، چرخه سلولی	<p><b>هدف:</b> سرطان همچنان یک چالش بهداشت جهانی است و سرطان تخمدان رتبه پنجم را در میان سرطان‌هایی که سلامت زنان را تحت تاثیر می‌گذارند قرار داشته و عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. آلفاکتوگلو تارات (AKG) یک متابولیت حیاتی در چرخه کربس است که اخیراً به‌عنوان یک عامل ضد سرطان مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه، تأثیر AKG را بر سلول‌های سرطان تخمدان در شرایط آزمایشگاهی بررسی می‌کند. <b>مواد و روش‌ها:</b> سلول‌های رده SKOV3 در محیط کشت کامل (RPMI1640 - سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد) کشت داده شدند و با غلظت‌های AKG از ۲۰ تا ۲۲۰ میکرومولار تیمار شدند. به‌منظور بررسی زیستایی سلول‌ها از تکنیک MTT استفاده شد. همچنین، زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی، کلونی‌زایی و مهاجرت سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.</p> <p><b>نتایج:</b> بر اساس نتایج بررسی زیستایی با استفاده از روش MTT، غلظت ۲۰۰ میکرومولار برای ادامه مطالعه انتخاب شد. بررسی شکل‌گیری کلونی، کاهش تعداد و اندازه کلنی را در گروه تحت درمان با غلظت ۲۰۰ میکرومولار نشان داد (<math>p &lt; 0.05</math>). همچنین زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی در گروه تیمار افزایش یافت که نشان‌دهنده کند شدن رشد سلول‌ها است (<math>p &lt; 0.05</math>). بررسی منحنی رشد نشان‌دهنده کاهش رشد سلول در گروه تیمار بود. بررسی پروفایل چرخه سلولی نشان داد که در گروه تیمار سلول‌های بیشتری در فازهای S و G1 متوقف می‌شوند. تست ترمیم خراش، مهاجرت سلولی کند را در حضور غلظت ۲۰۰ میکرومولار نشان داد. <b>نتیجه‌گیری:</b> نتایج ما نشان داد که AKG اثرات مہاری بر تکثیر، زیستایی و مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان دارد و پتانسیل آن را به‌عنوان یک درمان کمکی در کنار درمان‌های موجود برجسته کرد. تحقیقات بیش‌تر برای بررسی کامل‌تر تاثیر درمانی AKG در سرطان تخمدان ضروری است.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۰۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۴	

## ۱- مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین مسائل بهداشتی و عامل اصلی مرگ و میر در جهان است. این بیماری ناشی از رشد غیرقابل کنترل سلول‌ها است که به دنبال فعال‌سازی انکوژن‌ها یا غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوب‌کننده تومور ایجاد می‌شود (۱). سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می‌شود (۲). آمار نشان می‌دهد که در سال ۲۰۲۲، تقریباً ۹ میلیون مورد سرطان جدید در ایالات متحده تشخیص داده شد، که معادل بیش از ۵۰۰۰ مورد جدید در هر روز است. پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۳۰، این تعداد به ۲۲ میلیون افزایش یابد (۳). سرطان تخمدان یکی از رایج‌ترین انواع سرطان در زنان است که بالاترین نرخ مرگ و میر را نسبت به دیگر انواع سرطان‌ها دارد (۴، ۵). تعداد تلفات مرتبط با این بیماری به ۱۳۹۴۰ نفر تخمین زده شده است (۱). در سال ۲۰۲۰، تعداد مرگ و میر ناشی از سرطان تخمدان در ایران به ۱۲۶۹ مورد رسید که نسبت به موارد تازه تشخیص داده شده در سال ۱۹۶۶ افزایش یافته است (۲). بیشتر مطالعات بیرون تنی (in vitro) با استفاده از رده‌های سلولی مختلف سرطان تخمدان انجام می‌شوند. SKOV3 یکی از رده‌های سلولی مهم سرطان تخمدان است که از آسیت یک زن ۶۴ ساله قفقازی با ادنوکارسینوم سروزی تخمدان مشتق شده است. این سلول‌ها به فاکتور نکروز تومور حساس بوده و به سم دیفتری، سیس پلاتین و آدریامایسین مقاوم به اثر هستند (۶). رده سلولی SKOV3 کلونی‌هایی را در آگار نرم تشکیل می‌دهد که به‌عنوان یک سنجش جایگزین برای تومورزایی عمل می‌کند. از همه مهم‌تر این‌که تزریق داخل صفاقی این سلول‌ها به موش‌های دارای نقص ایمنی در عرض دو تا سه ماه، منجر به رشد تومورهایی شبیه آدنوکارسینوم سلول شفاف می‌شود (۷).

تاکتون روش‌ها و داروهای شیمیایی و گیاهی مختلفی برای درمان یا کنترل سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آلفاکتوگلو تارات (AKG)، یک واسطه کلیدی در چرخه کربس است که نقش مهمی در حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی و متابولیسم سلولی دارد (۸). AKG از ایزوسیترات و گلوتامات در چرخه کربس تولید می‌شود. این ترکیب ساخت آمینواسیدها، اکسیداسیون اسیدهای چرب، تولید انرژی و تشکیل رادیکال‌های آزاد را تنظیم می‌کند. همچنین، به‌عنوان یک مولکول پیامبر در بسیاری از فعالیت‌های شیمیایی بدن نیز نقش دارد. به‌دلیل داشتن عمل‌کردهای متابولیکی و غیر متابولیکی، AKG جزو ترکیبات آنالپروتیک در نظر گرفته می‌شود (۸). AKG به‌عنوان یک تنظیم‌کننده متابولیکی، نقش بسیار مهمی در تنظیم پاسخ‌های سلولی به شرایط هیپوکسی (کم‌اکسیژنی) و تغییرات در سطح ژنتیکی ایفا می‌کند. این تنظیم‌کننده متابولیکی علاوه بر نقش در فرآیندهای توموری، در تنظیم پاسخ‌های اپی‌ژنتیک (تغییرات در ساختار ژنوم) نیز نقش دارد. در تومورها، افزایش سطح AKG می‌تواند منجر به کاهش فعالیت تومور و حتی جلوگیری از پیشرفت آن شود. این افزایش ممکن است از طریق روش‌های مختلف انجام شود، از جمله استفاده از مکمل‌ها یا غیرفعال‌سازی آنزیم‌های متابولیکی مرتبط با آن (۹-۱۲). AKG نقش مهمی در تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها دارد و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان فعال عمل می‌کند. این ماده می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌تی، مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، از پراکسیداسیون لیپیدی و سمیت کبدی ناشی از مواد مختلف، از جمله آمونیاک جلوگیری کند. تحقیقات نشان می‌دهند که AKG نقش مهمی در جلوگیری از پیشرفت تومور و نیز در محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های مختلف دارد (۱۳-۱۶). می‌توان گفت که AKG می‌تواند تنظیم‌کننده طول عمر ارگانیزم‌ها باشد و از بیماری‌های مرتبط با افزایش سن جلوگیری کند (۲۰-۱۷). همچنین، این ترکیب نقش محافظتی در برابر آسیب‌های کبدی ناشی از لیپوپولی‌ساکاریدها دارد و حالت ردوکس (اکسیداسیون-احیا) را تثبیت کرده و از تخریب میتوکندری در سلول‌های

سرطانی جلوگیری می‌کند. این خصوصیت‌ها به AKG امکان می‌دهند که به‌عنوان یک عامل ضد سرطانی در مقابل فرآیندهای انکوژنیک عمل کند و در مطالعات جدید بر روی سرطان تخمدان نیز مورد بررسی قرار گیرد (۱۶، ۲۰، ۲۱).

باتوجه به نقش بسیار مهم AKG در کنترل بسیاری از رفتارهای سلول‌های طبیعی و سرطانی، در این مطالعه به بررسی تأثیر آن بر رشد، زیستایی، و مهاجرت سلولی/متاستاز سلول‌های سرطان تخمدان - رده SKOV3 پرداخته شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

**نوع مطالعه:** مطالعه از نوع تجربی (آزمایشی) است که در آن سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3 در آزمایشگاه با ماده AKG تیمار شده و زیستایی و رفتار تکثیر سلول‌ها با استفاده از تست‌های آزمایشگاهی مناسب مورد بررسی قرار گرفته است. **تهیه و کشت سلول‌های سرطان تخمدان رده SKOV3** سلول‌های SKOV3 از آزمایشگاه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه تهران تهیه در محیط کشت کامل (RPMI1640 - سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد - و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد) کشت شدند. این سلول‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، سلول‌ها با استفاده از تریپسین پاساژ داده شدند.

**سنجش فعالیت متابولیکی سلول با استفاده از تکنیک MTT:** برای پیدا کردن غلظت مناسب از AKG برای بررسی بر روی سلول‌های SKOV3، ابتدا تعداد ۵۰۰۰ سلول SKOV3 در پاساژ سوم در پلیت ۹۶ خانه و در ۱۲ گروه با محیط کامل کشت داده شد. بعد از اتمام ۲۴ ساعت انکوباسیون و بررسی وضعیت سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از AKG، در ۱۱ گروه از غلظت‌های (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰، ۲۰۰، ۲۲۰ میکرومولار AKG) و یک گروه کنترل تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت، محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و محیط کشت حاوی MTT به سلول‌ها اضافه شد. بعد از گذشت ۲ ساعت، محیط رویی چاهک‌ها دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها افزوده شد. جذب نوری پلیت توسط میکروتیتر پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ قرائت شد.

**محاسبه زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت سلول‌های SKOV3:** ابتدا ۱۰۰ هزار سلول در پاساژ سوم برای هر چاهک پلیت ۶ خانه کشت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، سلول‌ها به دو گروه کنترل تیمار (با ۲۰۰ میکرومولار AKG) تقسیم شدند. بعد از ۷۲ ساعت از تیمار، سلول‌های هر چاهک جمع‌آوری شدند و تعداد سلول‌های زنده با استفاده از لام نتویار شمارش شد و برای محاسبه زمان دوبرابر شدن سلول از سایت [www.omnicalculator.com](http://www.omnicalculator.com) استفاده شد.

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

**ترسیم منحنی رشد سلول‌های SKOV3:** برای بررسی روند رشد سلول‌های SKOV3 ابتدا تعداد ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ چاهکی با محیط کامل کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت (Zeiss) بررسی شده و سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG تیمار شدند (در گروه کنترل سلول‌ها هیچ غلظتی از AKG دریافت نکردن). سپس به‌صورت روزانه سلول‌های هر چاهک با استفاده از تریپسین از کف ظرف‌های کشت جدا شده و شمارش شدند تا برای ترسیم منحنی رشد استفاده شوند.

**توانایی کلونی‌هایی (CFE) (Colony Forming Assay) سلول‌های رده SKOV3:** تعداد ۱۵۰ سلول در هر چاهک یک پلیت ۶ چاهکی کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت و بررسی وضعیت سلول‌ها زیر میکروسکوپ، پلیت به گروه کنترل و تیمار تقسیم شد.

در گروه تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکرومولار تیمار شدند. پس از گذشت این ۷ روز، وضعیت کلونی‌ها زیر میکروسکوپ بررسی شد و محیط کشت چاهک‌ها دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با استفاده از محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، تثبیت شدند و در نهایت سلول‌ها با استفاده از رنگ کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شدند.

**بررسی مهاجرت سلول‌های SKOV3 تحت تیمار با AKG با استفاده از ایجاد خراش:** سلول‌های SKOV3 در چاهک‌های جداگانه در یک پلیت ۶ خانه کشت شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۵ درصد، میتومایسین (۱۰ میکرومولار) به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۳ ساعت، محیط حاوی میتومایسین خارج شد و چاهک‌ها با PBS شسته شدند. سپس با استفاده از یک تیپ کریستالی یک شیار مستقیم در وسط هر چاهک ایجاد شد. سپس چاهک‌ها با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG تیمار شدند و یک گروه به‌عنوان کنترل فقط با محیط کشت کامل نگهداری شدند. بلافاصله بعد از انجام خراش و نیز به‌صورت روزانه تا سه روز، چاهک‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Zeiss) بررسی و عکس‌برداری انجام شد.

**بررسی پروفایل چرخه سلولی سلول‌های SKOV3 تیمار شده با AKG با تکنیک فلوسایتومتری:** ابتدا ۲۰۰ هزار سلول SKOV3 را در هر چاهک پلیت ۶ چاهکی با محیط کامل کشت داده و انکوباسیون شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، چاهک‌ها به دو گروه کنترل و ۲۰۰ میکرومولار AKG تقسیم شده، محیط چاهک‌ها دور ریخته شده و AKG در محیط جدید حل شده و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت تیمار، سلول‌های هر چاهک با استفاده از تریپسین کنده شده و جهت بررسی پروفایل چرخه سلولی به شرکت بافت آزما منتقل شدند.

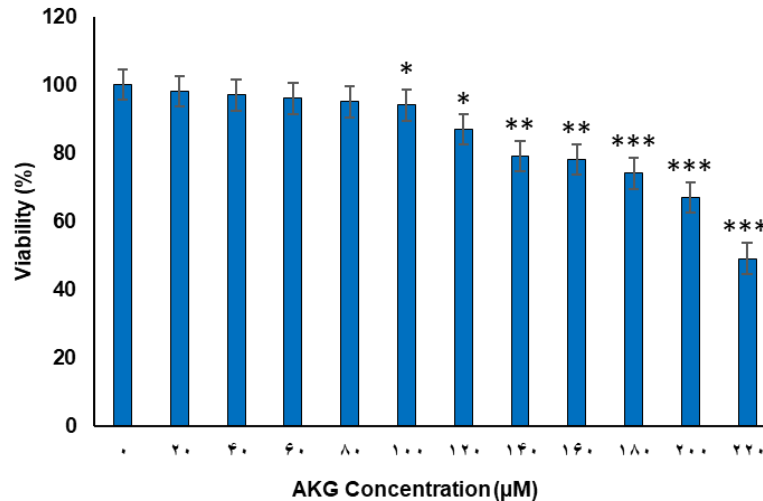
### ۳- آنالیز آماری

آنالیز با استفاده از نرم‌افزار PRISM ورژن ۹ انجام شده و تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار زیستی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها، از روش t-test و ANOVA یک‌طرفه استفاده شد و سطح معنی‌داری به مقدار  $(p < 0.05)$  در نظر گرفته شد.

### ۴- نتایج

#### بررسی زیستایی سلول‌های رده SKOV3 با روش MTT

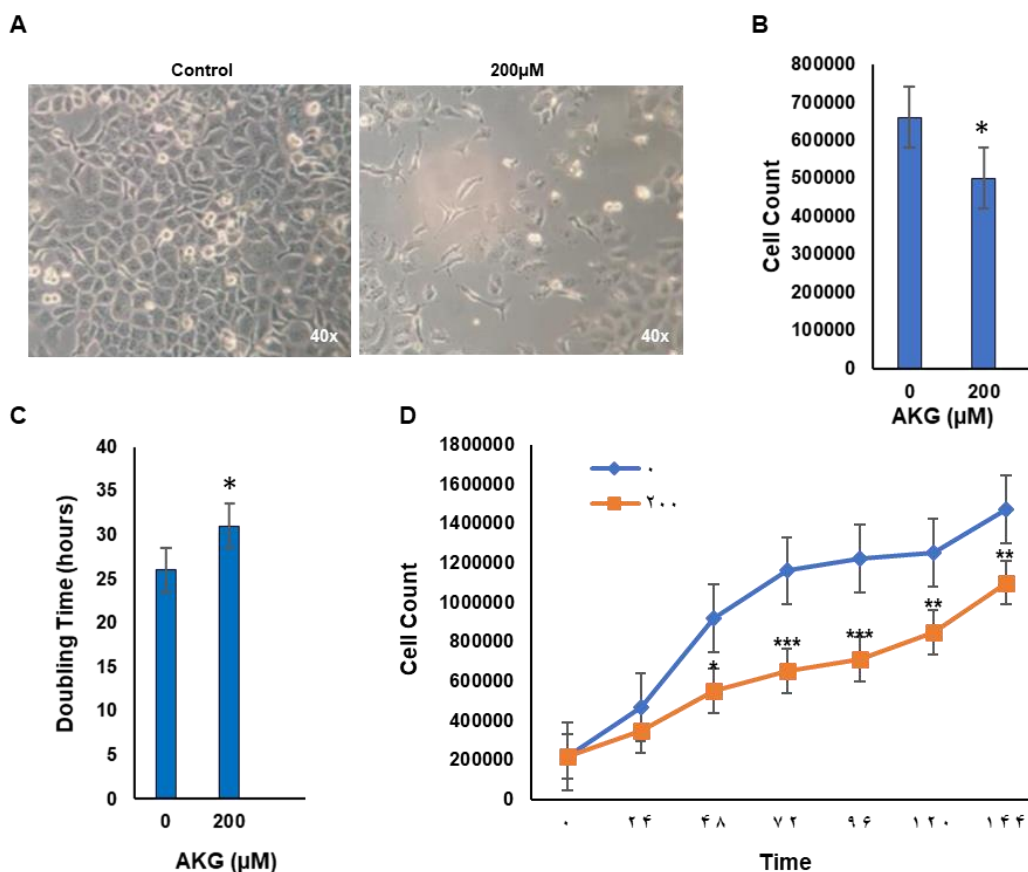
برای بررسی تأثیر AKG بر روی زنده‌مانی سلول‌های SKOV3، سلول‌ها با غلظت‌های ۲۲۰، ۲۰۰، ۱۸۰، ۱۶۰، ۱۴۰، ۱۲۰، ۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ میکرومولار AKG تیمار شدند. نتایج بررسی زنده‌مانی با استفاده از روش MTT نشان داد که با افزایش غلظت AKG، بقای سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار پیدا می‌کند (شکل ۱). بر اساس نتایج در غلظت ۲۲۰ میکرومولار، بقای سلول‌ها ۴۹ درصد بود ( $p < 0.001$ )، در غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶۷.۷۹ درصد بود ( $p < 0.001$ )، در غلظت ۱۸۰ میکرومولار ۷۴.۵ درصد بود ( $p < 0.001$ )، در غلظت ۱۶۰ میکرومولار ۷۸ درصد بود ( $p < 0.001$ )، در غلظت ۱۲۰ میکرومولار میزان زنده‌مانی ۸۷ درصد بود و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار میزان زنده‌مانی ۹۴ درصد بود ( $p < 0.001$ ). در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های پایین، کاهش رشد سلول‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتایج ارزیابی‌ها نشان می‌دهد که کاهش بقای سلول‌ها در گروه‌های تیمار به‌صورت وابسته به غلظت است (شکل ۱).



شکل ۱: بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف AKG بر میزان زنده‌مانی سلول‌های SKOV3 با تکنیک MTT. در غلظت‌های پایین کاهش رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل معنادار نبود. با افزایش غلظت AKG، رشد سلول‌ها کاهش یافت که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (تست ANOVA یک‌طرفه (آنالیز Brown-Forsythe)؛  $p < 0.05$  \*  $p < 0.01$  \*\*  $p < 0.001$  \*\*\* (ارزیابی با ۳ بار تکرار زیستایی انجام شده است).

### بررسی زمان دوبرابر شدن و منحنی رشد جمعیت سلول‌های رده SKOV3

برای بررسی زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی، سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکرومولار تیمار شدند و تراکم سلولی و میزان دوبرابر شدن پس از سه روز محاسبه شد. بررسی تراکم سلول‌ها زیر میکروسکوپ نشان داد که در گروه کنترل، تراکم سلولی بسیار بالا بوده؛ اما در گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار، رشد سلول‌ها کاهش یافته و تراکم سلولی پایین بوده و فضای خالی زیادی بین سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۲- A). همچنین شمار سلولی در روز سوم نتایج بررسی میکروسکوپی را تأیید کرد به طوری که تعداد سلول‌ها در گروه تیمار به صورت معنی‌داری از گروه کنترل کم‌تر بود (شکل ۲- B). محاسبه زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی نشان داد که زمان دوبرابر شدن تعداد سلول‌های گروه کنترل ۲۶ ساعت و در گروه تیمار با AKG این زمان ۳۱ ساعت است (شکل ۲- C). این نتایج نشان می‌دهند که در گروه تیمار با AKG، زمانی بیشتر نیاز است تا تعداد سلول‌ها دوبرابر شود، و این نشان می‌دهد که AKG نقش ممانعت‌کننده از سرعت رشد و دوبرابر شدن تعداد سلول‌ها را ایفا می‌کند و اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) برای بررسی تأثیر AKG بر رشد سلول‌های SKOV3، سلول‌ها در گروه کنترل و تیمار به صورت روزانه بررسی و شمارش شدند. نتایج شمارش روزانه و ترسیم منحنی رشد نشان داد که رشد سلول‌های تیمار شده با AKG نسبت به گروه کنترل به میزان معنی‌داری کاهش یافته بود ( $p < 0.05$ ). میزان سلول‌ها در زمان تیمار ۲۲۰۰۰۰ سلول بود. میزان سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت برای گروه کنترل ۴۷۰۰۰۰ سلول بود و برای گروه تیمار ۳۷۰۰۰۰ سلول بود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، میزان سلول‌ها برای گروه کنترل ۹۲۰۰۰۰ سلول شد و برای گروه تیمار ۵۱۰۰۰۰ سلول ( $p < 0.05$ ). بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار گروه کنترل ۱۱۹۰۰۰۰ سلول داشت و گروه تیمار ۶۴۰۰۰۰ سلول داشت ( $p < 0.001$ ). بعد از ۹۶ ساعت تیمار، میزان سلول‌های گروه کنترل ۱۲۵۰۰۰۰ سلول و گروه تیمار ۸۶۰۰۰۰ سلول بود ( $p < 0.001$ ). ۱۲۰ ساعت تیمار، گروه کنترل ۱۳۵۰۰۰۰ سلول و گروه تیمار ۸۹۰۰۰۰ سلول داشت ( $p < 0.01$ ). ۱۴۴ ساعت تیمار، میزان سلول‌های گروه کنترل ۱۴۷۰۰۰۰ سلول و گروه تیمار ۱۰۵۰۰۰۰ سلول با اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) سلول بود (شکل ۲- D).



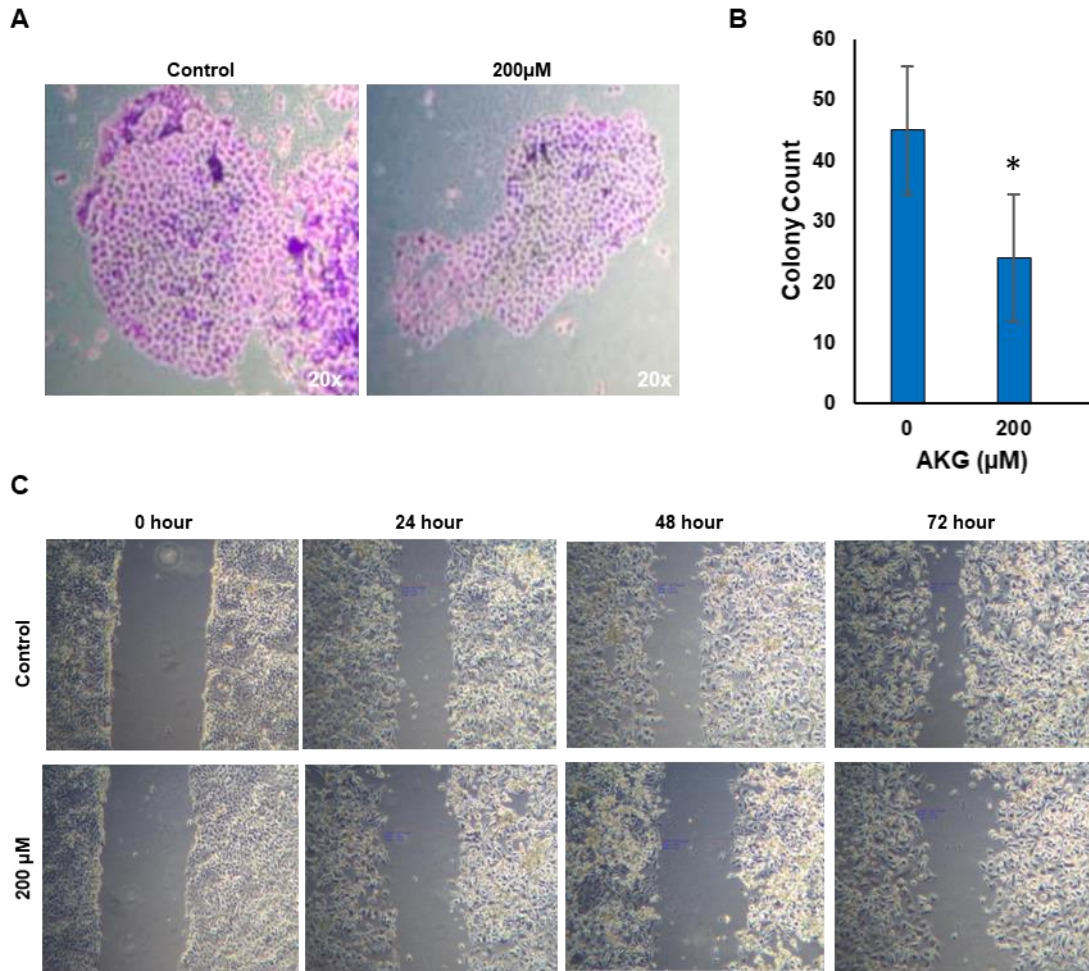
شکل ۲: بررسی تاثیر AKG بر رشد سلول‌های SKOV3. (A) تراکم سلول‌های SKOV3 در روند دوبرابر شدن سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت تیمار. گروه کنترل، که شامل تعداد زیادی سلول در پلیت است. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG، که رشد سلول‌ها کاهش یافته و فضای خالی بین سلول‌ها مشاهده می‌شود. (بزرگنمایی ۴۰ برابر). (B) بررسی دو برابر شدن جمعیت سلول‌های SKOV3 در شرایط تیمار با AKG. سلول‌ها بعد از ۳ روز نسبت به گروه کنترل مقایسه شدند. زمان دوبرابر شدن تعداد سلول‌ها در گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل، کم‌ترین میزان بوده و سلول‌ها در زمان یکسان تعداد سلول کم‌تری داشتند. (C) زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی سلول‌های SKOV3 در دو گروه کنترل و ۲۰۰ میکرومولار AKG. زمان دو برابر شدن در گروه تیمار کاهش یافته و این نشان می‌دهد AKG نقش بازدارندگی بر رشد سلول‌ها دارد. نتایج با ۳ تکرار زیستی مورد ارزیابی قرار گرفتند. (D) منحنی رشد سلول‌های SKOV3 بعد از تیمار با AKG. در یک بازه ۷ روزه رشد سلول‌ها در گروه کنترل نسبت به گروه تیمار شده با AKG بیش تر بوده است. نتایج با ۳ تکرار زیستی مورد ارزیابی قرار گرفتند (آزمون T-test؛ آزمون من ویتنی؛  $p < 0.05$ ؛  $p < 0.01$ ؛  $p < 0.001$ ).

### نتایج بررسی کلونی‌زایی و مهاجرت سلول‌های SKOV3 تیمار با AKG

برای ارزیابی توان کلونی‌زایی سلول‌های SKOV3، تعداد ۱۵۰ سلول در هر چاهک یک پلیت ۶ چاهکی کشت شده و سلول‌ها در دو گروه کنترل و گروه تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG به مدت یک هفته کشت شدند. مقایسه تعداد کلونی‌های سلول‌های SKOV3 در گروه تیمار شده با گروه کنترل نشان داد که کلونی‌های گروه کنترل نه تنها تعداد بیش‌تری نسبت به گروه تیمار شده داشتند، بلکه از نظر اندازه نیز بزرگ‌تر بودند (شکل ۳- A). بررسی تعداد کلونی‌ها پس از هفت روز تیمار با AKG نشان داد که گروه تیمار شده با AKG باعث کاهش معنی‌دار تعداد کلونی‌هایی سلول‌های SKOV3 در گروه تیمار می‌شود ( $p < 0.5$ ) (شکل ۳- B). این یافته‌ها نشان می‌دهد که AKG توانسته است تاثیر خود را بر کاهش کلونی‌زایی در سلول‌های سرطانی رده SKOV3 اعمال کند.



بررسی میزان مهاجرت سلول‌ها با استفاده از تکنیک ایجاد خراش و به مدت ۳ روز انجام شد. با تحلیل تصاویر مشاهده شد که مهاجرت سلولی، در سلول‌هایی که با AKG تیمار شده‌اند، کاهش یافته است (شکل ۳-C). نتایج نشان دادند که میزان متاستاز و حرکت سلولی در گروه تیمار، پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به گروه کنترل به طرز چشمگیری کاهش یافته است. در مقابل، در گروه کنترل، سلول‌ها از اطراف به محل خراش مهاجرت کرده و در آنجا تکثیر شده‌اند و تراکم سلولی افزایش یافته است. این نتایج نشان می‌دهند که تیمار با AKG موجب کاهش مهاجرت سلولی در مقایسه با گروه کنترل شده است، به عبارت دیگر، روند متاستاز در گروه تیمار به شدت کاهش یافته است.

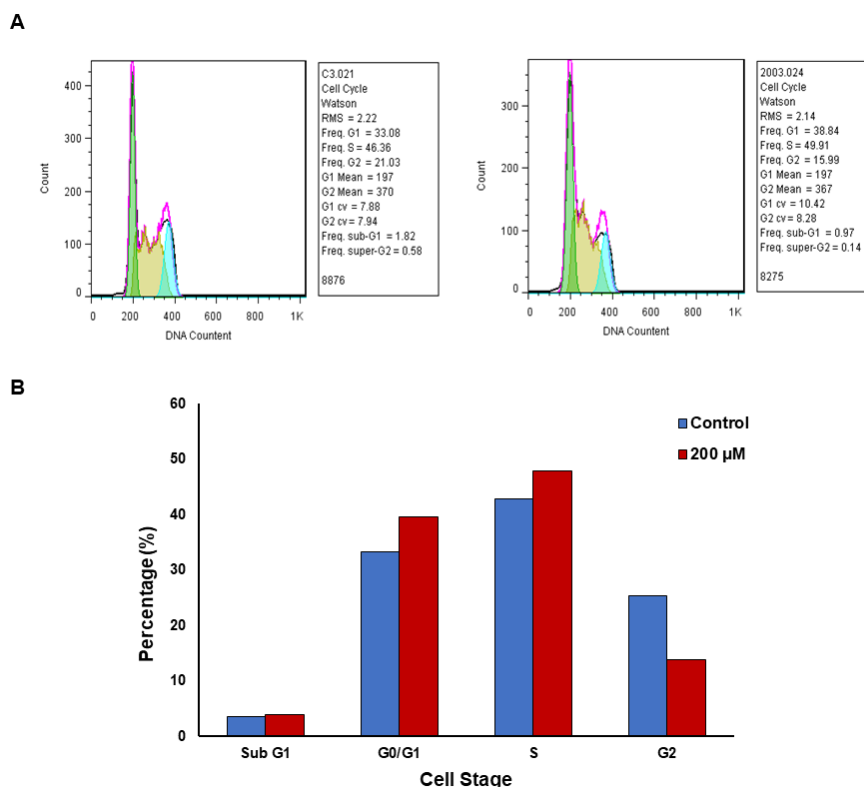


شکل ۳: بررسی تاثیر AKG بر پتانسیل کلونی‌زایی و مهاجرتی سلول‌های SKOV3. (A) کلونی‌های سلول‌های SKOV3 در گروه کنترل و تیمار. در گروه کنترل در مقایسه با گروه تیمار، اندازه کلونی‌ها بزرگتر و تعداد کلونی‌ها بیشتر است (بزرگنمایی ۲۰ برابر میکروسکوپ Zeiss). (B) نمودار تعداد کلونی‌ها در دو گروه کنترل و تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG. (C) بررسی روند مهاجرت سلولی در سلول‌های رده SKOV3 در لحظه خراش، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار با AKG و گروه کنترل. روند کلی حرکات سلولی در این مدت زمان نشان داد که حرکت سلول‌ها برای پر کردن خراش در گروه تیمار از گروه کنترل کمتر می‌باشد و همچنین تراکم سلولی در خراش برای گروه تیمار به نسبت کنترل کم‌تر می‌باشد (میکروسکوپ Zeiss بزرگنمایی ۴۰ برابر). داده‌ها میانگین سه تکرار زیستی برای هر غلظت است (آزمون T-test، اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$ ).

### بررسی پروفایل چرخه سلولی در سلول‌های رده SKOV3 تیمار شده با AKG

اثر AKG بر چرخه سلولی سلول‌های SKOV3 با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. پس از یک هفته تیمار، سلول‌ها در دو گروه، یک گروه کنترل و یک گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG، برای بررسی چرخه سلولی مورد ارزیابی

قرار گرفتند. درصد سلول‌ها در فازهای G1، S و G2 مشخص شد (شکل ۴). نتایج نشان داد که بیش‌ترین درصد سلول‌ها در فاز S و G1 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل وجود داشته است، هرچند از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در سلول‌های کنترل، سلول‌های موجود در مراحل G1، S و G2 به ترتیب ۳۳، ۴۶ و ۲۵ درصد از کل جمعیت سلولی را تشکیل می‌دادند، در حالی که این مقادیر برای گروه تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG به ترتیب ۳۸، ۴۹ و ۱۵ درصد بودند (شکل ۴). این داده‌ها نشان دادند که AKG باعث توقف سلول‌ها در مرحله S و G1 شده است.



شکل ۴: A. نمودارهای فلوسایتومتری در گروه کنترل و گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG. B. آنالیز آماری فازهای G1، S و G2 در سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG. نتایج نشان داد که AKG باعث توقف سلول‌ها در فاز G1 و S شده است. آزمایش‌ها با ۳ تکرار زیستی، ارزیابی شدند (تست ANOVA دوطرفه).

## ۵- بحث

سرطان تخمدان، پنجمین عامل رایج بروز سرطان در زنان و همچنین عامل اصلی مرگ و میر ناشی از بیماری‌های سرطانی در زنان است. با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه تحقیقات، جراحی، درمان‌های هورمونی، درمان‌های پرتویی و ایمونوتراپی، مقابله با این نوع سرطان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های علمی جامعه ماست. درمان‌های فعلی برای این نوع سرطان دچار مشکلات قابل توجهی هستند، از جمله عوارض جانبی ناخواسته، انتخاب‌های درمانی ناکارآمد و مقاومت در برابر داروها است؛ بنابراین، چالش اصلی کشف ترکیب‌هایی با قیمت مناسب و حساس به طور هدفمند به منظور افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی به درمان‌هاست.

AKG در گذشته، تنها به‌عنوان یک واسطه در فرآیندهای متابولیک در نظر گرفته می‌شد. اما در دهه‌های اخیر، نقش AKG مورد مرور و بازنگری قرار گرفته و حالا معلوم شده که در علاوه به عملکرد اصلی‌اش، در جنبه‌های مختلف دیگری نیز نقش دارد. این

نقش‌ها شامل عملکردهای فیزیولوژیک مهمی هستند. به‌عنوان مثال، در سیگنال‌دهی، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده بیان ژن، و همچنین در اثرات ضد پیری و تعدیل‌کننده در برابر پاسخ‌های استرس نقش دارد (۱۰). با توجه به نقش مهم AKG در متابولیسم سلول‌های سرطانی و برنامه‌ریزی سلولی، مشخص شده است که این متابولیت می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضد سرطانی برای مقابله با فرآیندهای انکوژنیک مورد استفاده قرار گیرد (۹، ۱۲، ۲۲). باید توجه داشت که سرطان تخمدان به‌عنوان یکی از بدخیمی‌های پر مرگ‌ومیر در جهان شناخته شده است. با در نظر گرفتن نرخ بالای بازگشت تومور بعد از برداشتن آن، مقاومت به درمان‌های شیمیایی و رکود در نرخ بقای بیماران، استراتژی‌های جدید در روند درمان و پیشگیری از سرطان تخمدان بسیار حیاتی است. در این مطالعه به بررسی اثرات AKG بر سرطان تخمدان، تأثیرات این ماده بر تومورزایی و رشد سلول‌های سرطانی تخمدان در سلول‌های SKOV3 پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که AKG اثرات مهاری بر تکثیر، زیستایی و مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان دارد.

در این تحقیق، نتایج حاصل از آزمایش‌های MTT نشان داد که غلظت‌های پایین AKG هیچ تأثیر معنی‌داری بر کاهش زیستایی سلول‌ها ندارند. با افزایش غلظت AKG از ۱۲۰ تا ۲۲۰ میکرومولار، مشاهده شد که میزان رشد و بقای سلول‌ها به کم‌تر از ۵۰ درصد از گروه کنترل کاهش یافت. تاکنون مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مختلفی برای نقش مهاری AKG در تکثیر سلول‌های سرطانی مختلف گزارش شده است. در مطالعه‌ای که توسط Kalawaj و همکارانش (۱۱) برای ارزیابی ظرفیت ضد سرطانی AKG انجام دادند مشخص شد که این ماده باعث مهار تکثیر و زیستایی در رده‌های سلولی مختلف سرطان استئوسارکوما می‌شود. در آن مطالعه، محققین از دو رده سلولی اولیه استئوسارکوم حاوی جهش TP53 یعنی Saos-2 (رده سلول بدون جهش p53) و HOS (جهش یافته p53) استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که تیمار سلول‌های Saos-2 و HOS با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار AKG باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد سلول‌ها می‌شود. مطالعات پیشنهاد می‌کنند که AKG نه تنها از سنتز DNA جلوگیری کرده و باعث القاء توقف چرخه سلولی در فاز G1 می‌شود، بلکه حتی اثرات ضد تکثیری در سلول‌های طبیعی نیز دارد (۲۳). این مولکول با مهار HIF و مهار فاکتور رشد اندوتلیالی (VEGF)، از رگ‌زایی و رشد تومور در سرطان جلوگیری می‌کند. همچنین، با تولید گلوتامین، سیرتات و ملات، AKG باعث افزایش ساخت لیپید و تامین انرژی مورد نیاز سلول‌های سرطانی می‌شود و در نتیجه به رشد و تومورزایی کمک می‌کند (۲۴). مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۲ برای ارزیابی اثر ضد تکثیری AKG بر سلول‌های آدنوکارسینوم کولون نیز تأیید کرد که AKG به‌طور قابل توجهی از تکثیر سلول‌های Caco2، HT-29 و LS-180 جلوگیری می‌کند (۱۲). همچنین این محققین گزارش کردند که AKG به‌طور قابل توجهی مهاجرت و تهاجم سلولی را کاهش می‌دهد که پتانسیل ضد متاستازیک این ترکیب را تأیید می‌کند. نتایج حاصل از بررسی منحنی رشد نشان داد که تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکرومولار AKG، باعث کاهش قابل توجه در رشد سلول‌ها می‌شود (۱۲). اخیراً نقش مهاری AKG در تکثیر و زیستایی سلول‌های لنفوم نیز گزارش شده است (۲۵). هر چند محققین به مکانیسم سلولی و مولکولی AKG در این سرطان نپرداختند، اما نشان دادند که تأثیر AKG بر سرکوب تکثیر سلولی وابسته به غلظت و زمان است.

در مطالعه حال حاضر، نتایج حاصل از کلونی‌زایی نشان داد که تعداد و اندازه کلونی‌ها در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. نقش مهارکنندگی AKG بر پتانسیل کلونی‌زایی در سرطان‌های دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفته است. هر چند در مطالعه حاضر مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در کاهش کلونی‌زایی ایجاد شده توسط AKG، مورد بررسی قرار نگرفت اما مطالعات انجام شده در سایر سرطان‌ها چندین مکانیسم را پیشنهاد داده‌اند. برای مثال گزارش شده است که AKG از طریق افزایش میزان نیتریک اکسید (NO) داخل سلول و تنظیم بیان آنزیم TET، از رشد سلول‌های سرطانی، کلونی‌زایی و متاستاز سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۲۲). از طرفی اخیراً مشخص شده است که بیان ترانسکتولاز (TKT)

با اندازه تومور در مدل موشی سرطان پستان مرتبط است می‌کند (۲۶). محققین مطالعه همچنین نشان دادند کاهش بیان TKT یا افزودن AKG باعث افزایش سطح سرکوب‌کننده‌های تومور (سوکسینات دهیدروناز و فومارات هیدراتاز) می‌شود که در نتیجه منجر به کاهش انکومتابولیت‌های سوکسینات و فومارات می‌شود. کاهش بیان TKT یا افزودن AKG باعث تغییر دینامیک متابولیسم گلوکز از گلیکولیز به فسفوریلاسیون اکسیداتیو شده و از کلونی‌زایی و متاستاز سلول‌های سرطان پستان جلوگیری می‌کند (۲۶).

در مطالعه حال حاضر بررسی چرخه سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که AKG باعث توقف بیشتر سلول‌ها در مرحله S و G1 می‌شود. هرچند در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری بین گروه تیمار و گروه کنترل مشاهده نشد. نتایج مطالعات قبلی در سایر سلول‌های سرطانی نشان می‌دهند که AKG باعث عدم توقف سلول‌ها در فازهای G1 و S می‌شود (۲۷). این مطالعات همچنین نشان داده‌اند که AKG می‌تواند بیان پروتئین‌های مرتبط با چرخه سلولی مانند سیکلین D1 و مهار کننده‌های کیناز وابسته به سیکلین p21 را تعدیل کند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در پاسخ به سیگنال‌های میتوزنیک و تنظیم انتقال از فاز G1 به S در چرخه سلولی دارند. همچنین در استئوسارکوم، AKG باعث توقف چرخه سلولی در فازهای G1 و S می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۸). بررسی مهاجرت سلولی در مطالعه حاضر نشان داد که که تیمار سلول‌ها با AKG، مهاجرت سلولی را نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد. پس از ۲۴ ساعت تیمار، کاهش مهاجرت سلولی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و این کاهش تا ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار ادامه یافت. این نتایج نشان دادند که مهاجرت پس از تیمار با AKG کاهش می‌یابد. در تایید نتایج مطالعه حاضر، اخیراً گزارش شده است که AKG نقش مهمی بر متاستاز و تهاجم سلول‌های سرطانی استئوسارکومای انسان دارد. (۱۱). به نظر می‌رسد که AKG با مهار تبدیل اپی‌تلیال به مزانشیم (EMT) باعث کاهش مهاجرت می‌شود، هرچند به مطالعات پیش‌تر در این زمینه نیاز است.

## ۶- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان دادند که استفاده از AKG باعث کاهش زیستایی، تکثیر، پتانسیل کلونی‌زایی و مهاجرت سلول‌های سرطان تخمدان می‌شود. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که AKG به‌عنوان یک متابولیت طبیعی بدن می‌تواند در درمان یا کنترل سرطان تخمدان موثر باشد. با انجام تحقیقات گسترده‌تر و بررسی سایر اثرات AKG، امکان استفاده از آن به‌عنوان یک روش کمک درمانی جدید در مبارزه با سرطان تخمدان وجود دارد و ممکن است به همراه سایر روش‌های درمانی موجود، در درمان سرطان تخمدان مفید واقع شود.

## ۷- منابع

1. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et al. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):21087-113.
2. Nagai H, Kim YH. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J Thorac Dis*. 2017;9(3):448-51.
3. Liu ZY, Wang C, Zhang YJ, Zhu HL. Combined lifestyle, mental health, and mortality in US cancer survivors: a national cohort study. *J Transl Med*. 2022;20(1):376.
4. Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(6):943-64.
5. Kujawa KA, Lisowska KM. [Ovarian cancer--from biology to clinic]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69:1275-90.

6. Paramee S, Sookkhee S, Sakonwasun C, Na Takuathung M, Mungkornasawakul P, Nimlamool W, et al. Anti-cancer effects of *Kaempferia parviflora* on ovarian cancer SKOV3 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):178.
7. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
8. Meng X, Liu H, Peng L, He W, Li S. Potential clinical applications of alpha-ketoglutaric acid in diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2022;25(5).
9. Abla H, Sollazzo M, Gasparre G, Iommarini L, Porcelli AM. The multifaceted contribution of  $\alpha$ -ketoglutarate to tumor progression: An opportunity to exploit? *Semin Cell Dev Biol*. 2020;98:26-33.
10. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016;24(1):1-8.
11. Kaławaj K, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Żurek A, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszeń M, et al. 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. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
12. Rzeski W, Walczak K, Juszczak M, Langner E, Pożarowski P, Kandefer-Szerszeń M, et al. Alpha-ketoglutarate (AKG) inhibits proliferation of colon adenocarcinoma cells in normoxic conditions. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47(5):565-71.
13. Tran TQ, Hanse EA, Habowski AN, Li H, Ishak Gabra MB, Yang Y, et al.  $\alpha$ -Ketoglutarate attenuates Wnt signaling and drives differentiation in colorectal cancer. *Nat Cancer*. 2020;1(3):345-58.
14. Schemitt EG, Hartmann RM, Colares JR, Licks F, Salvi JO, Marroni CA, et al. Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure. *World J Hepatol*. 2016;8(11):2019.
15. Ali R, Mittal G, Sultana S, Bhatnagar A. Ameliorative potential of alpha-ketoglutaric acid (AKG) on acute lung injuries induced by ammonia inhalation in rats. *Exp Lung Res*. 2012;38(9-10):435-44.
16. Liu S, He L, Yao K. The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. *Biomed Res Int*. 2018;2018:3408467.
17. Radzki RP, Bienko M, Pierzynowski SG. Anti-osteopenic effect of alpha-ketoglutarate sodium salt in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2012;30(6):651-9.
18. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids*. 2016;48(9):2067-80.
19. Bayliak MM, Lylyk MP, Shmihel HV, Sorochnyńska OM, Manyukh OV, Pierzynowski SG, et al. Dietary alpha-ketoglutarate increases cold tolerance in *Drosophila melanogaster* and enhances protein pool and antioxidant defense in sex-specific manner. *J Therm Biol*. 2016;60:1-11.
20. Mullen AR, Hu Z, Shi X, Jiang L, Boroughs LK, Kovacs Z, et al. Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects. *Cell Rep*. 2014;7(5):1679-90.
21. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, et al. The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*. 2014;510(7505):397-401.
22. Atlante S, Visintin A, Marini E, Savoia M, Dianzani C, Giorgis M, et al.  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase inhibition counteracts breast cancer-associated lung metastasis. *Cell Death Dis*. 2020;11(7):118.
23. Kaławaj K, Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Żurek A, Bojarska-Junak A, Kandefer-Szerszeń M, et al. 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*. 2020;21(24):9406.
24. Baksh SC, Finley LWS. Metabolic Coordination of Cell Fate by  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Trends Cell Biol*. 2021;31(1):24-36.
25. Jaafar C, Ethiraj P, Qiu Z, Lin A-P, Aguiar R. Alpha-Ketoglutarate Suppresses MYC and mTORC1 and Displays Anti-Lymphoma Activity. *Blood*. 2022;140(Supplement 1):2046-7.

26. Tseng CW, Kuo WH, Chan SH, Chan HL, Chang KJ, Wang LH. Transketolase Regulates the Metabolic Switch to Control Breast Cancer Cell Metastasis via the  $\alpha$ -Ketoglutarate Signaling Pathway. *Cancer Res.* 2018;78(11):2799-812.
27. Rzeski W, Walczak K, Juszczak M, Langner E, Pożarowski P, Kandefler-Szerszeń M, et al. Alpha-ketoglutarate (AKG) inhibits proliferation of colon adenocarcinoma cells in normoxic conditions. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2012;47(5):565-71.
28. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Izzo V, Pol J, Pierredon S, Enot D, et al. Lethal Poisoning of Cancer Cells by Respiratory Chain Inhibition plus Dimethyl  $\alpha$ -Ketoglutarate. *Cell Rep.* 2019;27(3):820-34.e9.