زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره اول، پاییز ۱٤۰۰، صفحات ۱۲۷- ۱۱۹

مقاله پژوهشی

بررسی اثر داروی ضد التهابی غیراستروئیدی M2000 بر بیان ژن‌های التهابی در سلول‌های سرطان پروستات

فاطمه مقبلی[۱]، محمدمراد فرج اللهی[۱*]، عباس میرشفیع[۲]، منیره محسن زادگان[۳]

۱-گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

٤- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: mahdiy@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۸

چکیده

التهاب یک روند فیزیولوژیکال است که با آسیب بافتی و با وجود عوامل عفونت‌زای مختلف شروع می‌شود و مردانی که در بافت پروستات غیرسرطانی آن‌ها علائم التهاب مزمن مشاهده می‌شود حدود دو برابر بیشتر از دیگر مردان به سرطان پروستات پیشرفته مبتلا می‌شوند. با توجه به اهمیت فاکتورهای التهابی در تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطان پروستات بر آن شدیم اثر داروی ضد التهابی M2000 را روی دو ژن التهابی دخیل در تهاجم سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار دهیم. برای بررسی داروی M2000، ابتدا سلول‌های PC3 با استفاده از محیط RPMI به همراه ۱۰درصد FBS و ۱درصد PenStrep کشت داده شد سپس سلول‌ها با داروی M2000 با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار شدند و پس از ۲٤ ساعت بیان ژن‌های التهابی *il8* و *NF-κB* با استفاده از Real time RT-PCR بررسی شد. در این مطالعه بیان ژن *NF-κB* در تمامی تیمارها در RT-PCR با کاهش همراه بود. در حالی که ژن *IL-8* در غلظت ۵۰µg/ml کاهش بیان نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که داروی M2000 قابلیت کاهش بیان ژن‌های *il8* و *NF-κB* دخیل در تومورزائی و تهاجم سلول‌های سرطان پروستات را دارا می‌باشد که می‌تواند زمینه ساز مطالعات آینده برای کنترل هر چه بهتر بیماران مبتلا به سرطان پروستات باشد.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، داروی NSAID، التهاب در سرطان، التهاب.

مقدمه

سرطان پروستات در رتبه‌ی سوم سرطان‌های کشنده در آمریکا قرار دارد که رتبه اول و دوم به ترتیب مربوط به سرطان ریه و سرطان کولورکتال می‌باشد (۱٦). میزان بروز سرطان پروستات در مناطق مختلف دنیا بسیار متفاوت است. بیشترین میزان بروز در آمریکای شمالی و کمترین میزان بروز مربوط به آسیای جنوبی است (٤). التهاب یک روند فیزیولوژیکال است که با آسیب بافتی و با وجود عوامل عفونت‌زای مختلف شروع می‌شود. روند التهاب به یک آبشاری از عوامل شیمیایی برای ریشه‌کن کردن عوامل بیماری‌زا، پاکسازی بافت و باقیمانده‌های سلول‌ها، بازسازی اپی‌تلیوم و بازسازی استروما منتهی می‌شود (۸). باقی‌ماندن میزان این فاکتورها در سطح بالا، خود باعث رشد و تقسیم

سلولی کنترل نشده و افزایش ناپایداری ژنوم می‌شود. ناپایداری ژنومی (مثل فعال شدن انکوژن‌ها و یا کاهش بیان ژن‌های ممانعت کننده از سرطانی شدن سلول) با تقسیم سلولی بدون کنترل در کنار افزایش میزان فاکتورهای رشد باعث گسترش انواع بدخیمی‌ها مانند سرطان پروستات می‌شود (۱۴، ۱). مردانی که در بافت پروستات غیرسرطانی آن‌ها علائم التهاب مزمن مشاهده می‌شود حدود دو برابر بیشتر از دیگر مردان به سرطان پروستات پیشرفته مبتلا می‌شوند (۱۷).

در شرایط التهابی بیان کموکاین‌های اختصاصی، یک کلاس از پروتئین‌های کوچک محلول، با فعالیت شیمیایی مخصوص بطور قابل توجهی تنظیم می‌شوند (۱۸).

برخی مطالعات نقش کلیدی کموکاین‌ها در تومورزایی را نشان می‌دهند (۲، ۱۹). با توجه به اهمیت التهاب در سرطان پروستات بر آن شدیم اثر داروی M2000 (β-D-Mannuronic Acid) یک داروی نوین کوچک مولکول ضد التهابی غیراستروئیدی یا NSAID (۱۱) را بر کاهش بیان ژن‌های التهابی در سلول‌های سرطان پروستات بررسی کنیم. میزان پایداری و اثرات ضدالتهابی M2000 در مدل‌های حیوانی مختلف مبتلا به آنسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE)، آرتریت ناشی از ادجوانت (AIA)، سندرم نفروتیک و گلومرولونفریت حاد، آزمایش شده‌است (۱۱، ۱۲).

اثر M2000 در چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن آن‌ها از جمله SOD2، CAT،GPX1 و GST رضایت بخش بوده‌است (۷).

IL-8 یکی از اعضاء خانواده کموکاین‌ها می‌باشد که ویژگی‌های کموتاکتیک، تومورزایی و رگ‌زایی آن به خوبی شناخته شده‌است (۲۰). همچنین COX-2 یک پروتئین مرتبط با التهاب است و باعث تولید پروستاگلاندین‌ها می‌شود؛ که رگ‌زایی و مهاجرت سلولی را ترویج کرده و آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۱۰). مدت‌هاست برای NF-κB نمونه‌ای از مسیر سیگنالینگ پیش-التهابی در نظر گرفته شده‌است که بیشتر براساس فعال شدن NF-κB توسط سیتوکاین‌های التهابی مانند اینترلوکین۱ (IL-1) و فاکتور نکروز تومور α(TNFα) می‌باشد. اما التهاب یک روند فیزیولوژیک پیچیده است و نقش NF-κB در پاسخ التهابی از طریق مطالعات آزمایشگاهی بدست نمی‌آید. در سال‌های اخیر مشخص شده‌است که حداقل دو مسیر مجزا برای فعال شدن NF-κB وجود دارد. مسیر ابتدایی که توسط تولیدات باکتریایی و سیتوکاین‌هایی مثل TNF-α و IL-1، که معمولاً منجر به فعال شدن Rel-A یا Rel-c می‌شود. که RelA بیان ژن‌های پیش-التهابی و ژن‌های مورد نیاز سلول برای زنده ماندن را تنظیم می‌کند (۱۰).

مواد و روش‌ها

کشت سلول: برای بررسی اثر داروی M2000 از رده سلولی سرطانی PC3 تهیه شده از بانک سلولی پاستور استفاده شد. برای کشت این رده سلولی از محیط کشت RPMI1640 به همراه ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین استفاده گردید.

تیمار سلول‌ها: پس از کشت سلول‌ها در فلاسک ۲۵T، از یکی از فلاسک‌ها به عنوان کنترل بدون تیمار، استخراج RNA انجام شده و در دو فلاسک ۲۵T که به تراکم ۹۰ درصد رسیده بود غلظت ۲۵µg/ml و ۵۰µg/ml به ترتیب عنوان low dose و high dose در محیط کشت افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه و سپس استخراج RNA از هریک بصورت جداگانه انجام شد.

RT-PCR: به‌منظور بررسی تغییرات بیان ژن‌های *il-8* و *NF-κB* در سلول‌های تیمار شده با داروی M2000 آزمون Real time RT-PCR استفاده شد. برای اینکار

ابتدا استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون و برای سنتز cDNA از کیت Thermo Scientific استفاده شد. پس از طراحی پرایمرهای موردنیاز از سایت NCBI، پرایمرها توسط شرکت سیناکلون سنتز (جدول ۱) شد. میزان و غلظت ترکیبات استفاده شده در تست RT-PCR طبق دستور کیت RealQ plus 2x Master Mix Green شرکت Ampliqon استفاده شد.

فلوسایتومتری: در این پروژه برای بررسی میزان بیان پروتئین NF-κB از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. برای انجام این آزمون، ابتدا سلول‌ها در طول ۲٤ ساعت تیمار شده، یکی از آن‌ها به عنوان نمونه کنترل منفی بصورت جداگانه مراحل را بدون مجاورت با آنتی‌بادی طی کرد. ابتدا برای فیکس و ثابت کردن سلول‌ها از بافر پارافرمالدهید ۲ درصد استفاده شده، سپس برای نفوذپذیر کردن غشاء سلول‌ها از بافر تریتون X100 ۱ درصد استفاده شد و ۲۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی به هر نوع تیمار افزوده و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. درنهایت سوسپانسیون سلولی در لوله‌های مخصوص، برای خوانش در دستگاه قرار داده شد.

زایموگرافی: ردیابی شکل‌های فعال MMPها همانطور که در مطالعات گذشته بیان شده‌است، همراه با کمی تغییرات بررسی شد. برای انجام این تست پس از ۲٤ ساعت تیمار، سوپرناتانت ۳ نمونه (بدون تیمار، تیمار با غلظت‌های ۲۵ µg/ml و ۵۰ µg/ml از داروی M2000) برای بررسی هریک از پروتئین‌های MMP-2 و MMP-9 جمع‌آوری شد. به عنوان سوبسترای اختصاصی آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ و ۹ به مقدار ۲mg/ml ژلاتین A، به ژل پلی‌آکریلامید افزوده شد. محیط کشت رویی سلول‌ها در غیاب مواد احیاکننده به‌مدت ۳ ساعت با جریان الکتریکی ۸۰ ولت روی این ژل الکتروفورز شد. سپس، ژل‌ها دو ساعت در ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۲/۵ درصد Triton X-10 شسته شد تا SDS از ژل‌ها خارج شود؛ در نهایت ژل‌ها یکبار با آب مقطر شسته شد و در بافر زایموگرافی ابتدا به مدت۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده‌شده و ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ژل با کوماسی‌بلوG ۰/۵ درصد در متانول و اسیداستیک گلاسیال رنگ‌آمیزی و برای رنگ‌بری در آب مقطر قرار داده شد. در نهایت اینتسیتی نواحی بی‌رنگ شده (باندها) توسط نرم‌افزار Image J مشخص شده.

آزمون‌های آماری: در این مطالعه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت. برای مقایسه تفاوت بین گروه‌های مختلف از تحلیل آنالیز واریانس OneWay ANOVA استفاده شد. در تمامی مقایسه‌ها $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها با نرم افزار GraphPad Prism 8 رسم شدند.

جدول ۱- توالی هریک از پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن و طول هرکدام

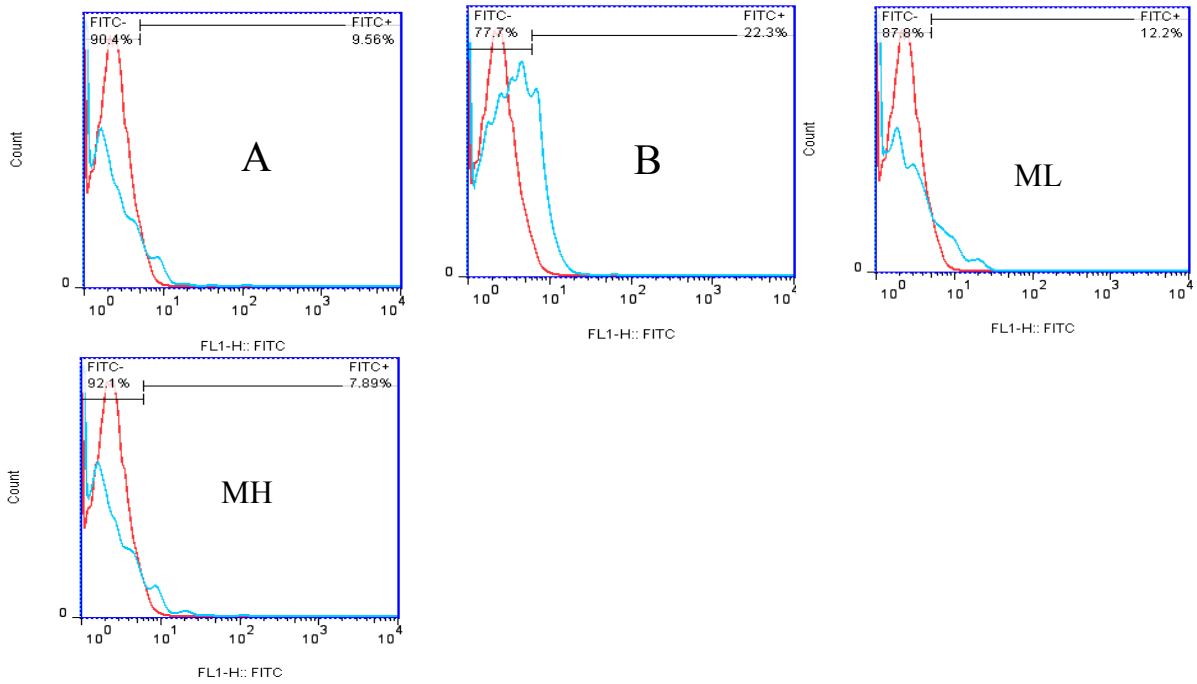
نام پرایمر	توالی 3'→5'	طول پرایمر
IL-8 F	TTGCCAAGGAGTGCTAAAGAA	۲۱
IL-8 R	GCCCTCTTCAAAAACTTCTCC	۲۱
NF-κB F	TGGAGTCTGGGAAGGATTTG	۲۰
NF-κB R	CGAAGCTGGACAAACACAGA	۲۰
GAPDH-F	5-TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3.	۲۱
GAPDH-R	5-CGCCCCACTTGATTTTGGA-3.	۱۹

نتایج

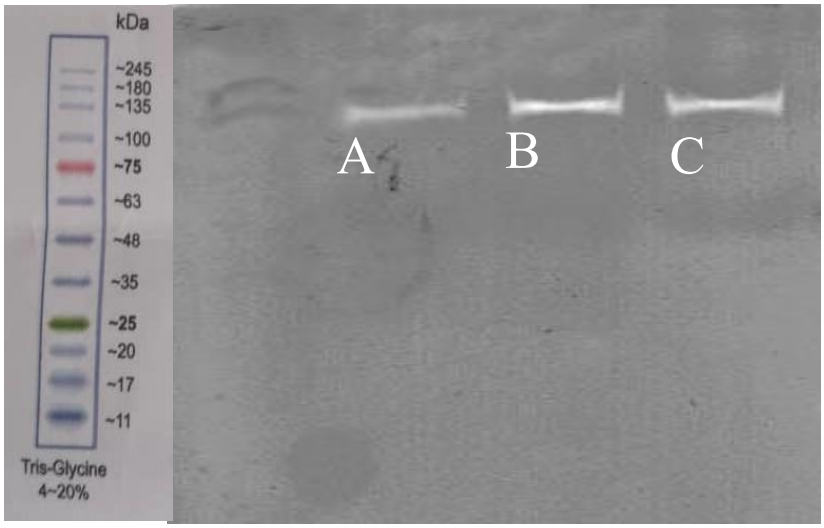
ژن‌هایی که بیان آن‌ها در این قسمت بررسی شد، در ایجاد التهاب و متاستاز سلول‌های سرطانی دخیل هستند. پس از انجام محاسبات مربوط به نتایج بدست آمده از RT-PCR، نمودارهای مرتبط با تغییرات بیان هریک از ژن‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 8 رسم گردیده و با نرم‌افزار SPSS از طریق روش One way ANNOVA آنالیز داده‌ها انجام شد. تغییرات بیان هریک از ژن‌ها در نمودارهای ۱ و ۲ آمده‌است.

فلوسایتومتری: گروه تیمار شده با دارو در دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل (تیمار نشده با دارو)، در بیان این پروتئین کاهش معنی‌داری ($p < ۰/۰۰۰۱$) مشاهده شد.

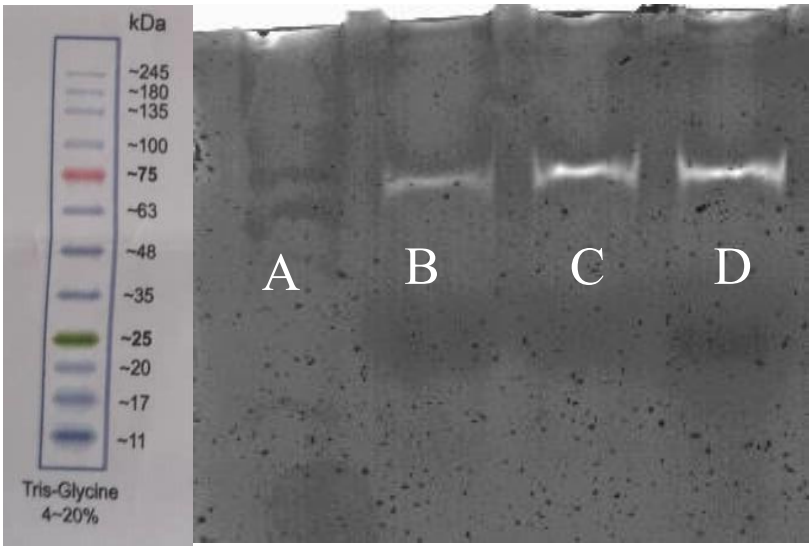
زایموگرافی: همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌کنید نمونه‌های تیمار شده با دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داروی M2000 در محاسبات میران شدت باندها نسبت به نمونه تیمار نشده کاهش فعالیت پروتئین MMP-2 نشان ندادند. همچنین کاهش فعالیت MMP-9 مشاهده نشد.



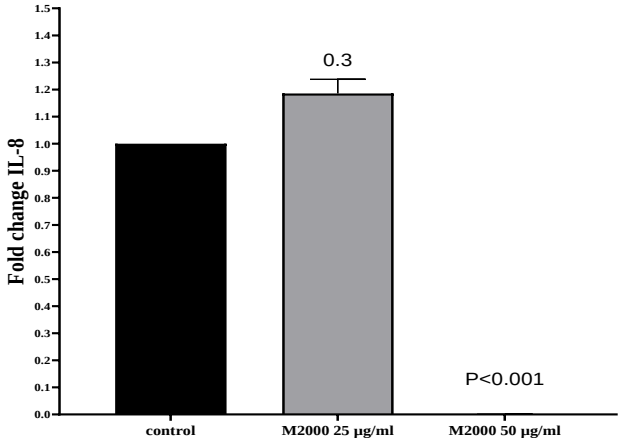
شکل ۱- تصویر نتایج تست فلوسایتومتری. A: کنترل منفی، B: بدون تیمار، ML: نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ، MH: نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر



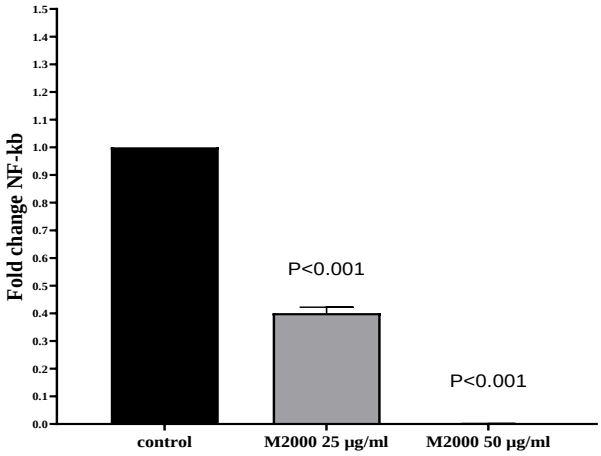
شکل۲- سمت چپ تصویری از مارکر استفاده شده. تصویر ژل زایموگرافی پروتئین MMP-2 با اندازه ۷۲ کیلودالتون را نشان می‌دهد که تمامی باندها در نزدیکی باند ۷۵ کیلودالتون قرار دارند. چاهک A: مارکر زایموگرافی تریس گلایسین. چاهک B کنترل بدون تیمار، چاهک C: نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ، D: نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر



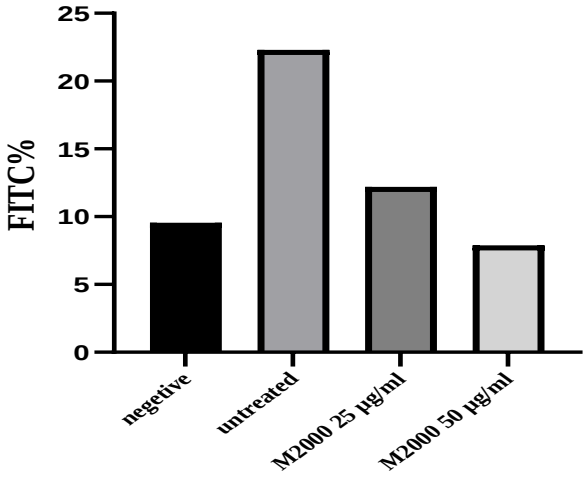
شکل ۳- سمت چپ تصویری از مارکر استفاده شده. تصویر سمت راست ژل زایموگرافی پروتئین MMP-9 با اندازه ۹۲ کیلودالتون را نشان می‌دهد که تمامی باندها در نزدیکی باند ۱۰۰ کیلودالتونی قرارگرفتند. چاهک A: مارکر زایموگرافی تریس گلایسین. چاهک B کنترل بدون تیمار، چاهک C: نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ، D: نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر



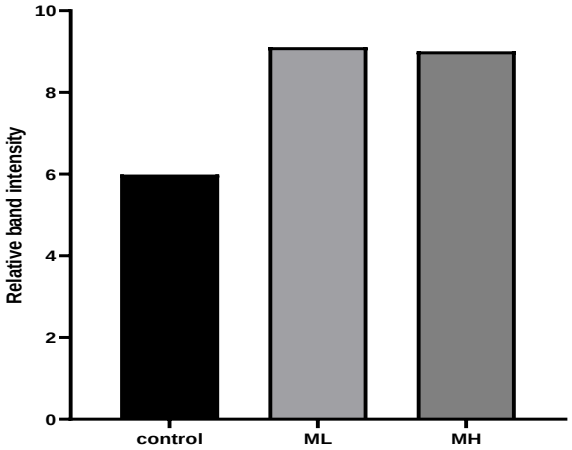
نمودار ۱- نمودار تغییرات بیان (Fold change) ژن *IL-8* در تیمار داروی M2000 بر سلول‌های PC3 (در تمامی نمونه‌ها $p < ۰/۰۵$ معنی دار محسوب شد) نمونه تیمار شده با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دارو کاهش بیان معنی‌دار داشتند.



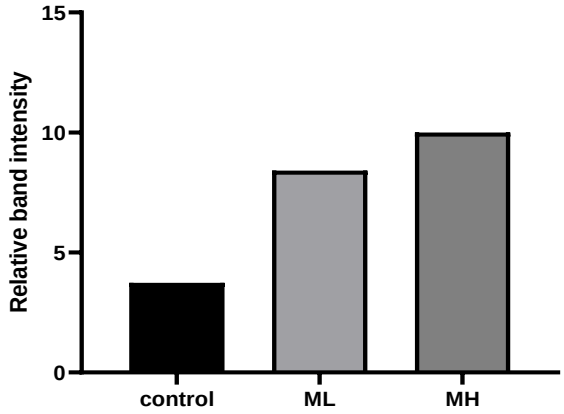
نمودار ۲- نمودار تغییرات بیان (Fold change) ژن *NF-κB* در تیمار در تیمار توسط داروی M2000 انجام شده بر سلول‌های PC3 (در تمامی نمونه ها $p < ۰/۰۵$ معنی دار محسوب شد) تمامی نمونه‌ها کاهش بیان معنی‌دار نسبت کنترل گروه خود داشتند.



نمودار ۳- نمودار نتایج تست فلوسایتومتری. از سمت چپ نمودار کنترل منفی، بدون تیمار، نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ، نمونه تیمار شده با داروی M2000 غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر



نمودار ٤ نمودار نتایج تغییرات بیان پروتئین MMP-2 بر اساس میزان اینتنسیتی هر باند در ژل زایموگرافی



نمودار ۵ نتایج تغییرات بیان پروتئین MMP-9 بر اساس میزان اینتنسیتی هر باند در ژل زایموگرافی

بحث

التهاب نقش مهمی در رگ‌زایی، تهاجم و تخریب سیستم ایمنی اکتسابی دارد. در مردانی که دچار عفونت شدید در پروستات خود هستند ریسک سرطان پروستات دو برابر بیشتر از بقیه مردان است. عفونت و دسترسی میکروب‌ها به مجاور سلول‌های توموری غده پروستات بسیار شایع‌تر از غده پستان می‌باشد. عفونت و در نتیجه التهاب از تنظیم کننده‌های مهم اپی‌ژنتیک در پیشرفت تومور محسوب می‌شوند (٦).

به همین دلیل برآن شدیم تا اثر داروی M2000 که یک داروی ضد التهابی است را بر سلول‌های سرطان پروستات بررسی کنیم. فعال شدن یک کمپلکس التهابی باعث کاتالیز شدن کاسپاز ۱ به زیرواحدهای p10 و p20 می‌شود که باعث شروع تولید و ترشح IL-8 می‌شود (۱۳). در مطالعه فتاحی و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر بیماران مبتلا به انکلوزینگ اسپوندیلیت تمامی

غلظت‌های داروی M2000 نسبت به گروه تیمار نشده اثری بر سطح بیان ژن‌های *IL-8*، *Bcl2* و *CD49* دیده نشد (۵). در این پژوهش بیان ژن *IL-8* در سلول‌های تیمار شده با داروی M2000 با غلظت ۵۰ µg/ml، کاهش بیان چشم‌گیری مشاهده شد. این دارو توانست باعث کاهش بیان این ژن در سلول‌های PC3 شود و اثر آن وابسته به غلظت می‌باشد. NF-κB یک فاکتور

رونویسی است که بیان چندین ژن را القا می‌کند که اکثر آن‌ها در پاسخ ایمنی نقش دارند. این پروتئین در روند التهاب و پاسخ‌های ایمنی، رشد، تقسیم سلول و آپوپتوز، نقش بسیار مهمی دارد. فعالیت نامناسب آن می‌تواند به اختلالات خودایمنی، التهاب مزمن و انواع سرطان‌ها مرتبط باشد (۳).

روزبه‌خوانی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان‌دادند که M2000 می‌تواند سطح بیان ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنالینگ TLR/NF-κB در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید کاهش دهد (۱٤). در مطالعه‌ای بر بیماران مبتلا به انکلوزینگ اسپوندیلیت توسط فتاحی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشاهده شد M2000 به عنوان داروی NSAID مؤثر جدید با ویژگی سرکوب گری سیستم ایمنی همراه با تحریک مرگ سلولی، باعث کاهش بیان ژن *NF-κB* شده و درنتیجه احتمالاً می‌تواند به عنوان دارویی مناسب برای کاهش خطر گسترش بیماری‌های التهابی و سرطان، باشد (۵).

بررسی ژن *NF-κB* نیز، کاهش بیان را در اثر تیمار با هر دو غلظت ۵۰ µg/ml و ۲۵ دارو نشان داد که نشان از اثر ضد التهابی دارو بر بیان این فاکتور نسخه برداری در سلول‌های سرطان پروستات می‌باشد. مشاهدات در این مطالعه نشان داد مطابق با مطالعات گذشته این دارو باعث کاهش بیان NF-κB می‌شود.

نتیجه‌گیری

در کل نتایج مطالعه حاضر نشان داد که M2000 قابلیت کاهش بیان ژن‌های التهابی دخیل در تومورزائی و تهاجم سلول‌های سرطان پروستات را دارا می‌باشد که می‌تواند زمینه ساز مطالعات آینده برای کنترل هر چه بهتر سرطان پروستات باشد.

منابع

1. Albini A., Sporn MB. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews Cancer*, 7(2): 139-147.

2. Atretkhany K.-S., Drutskaya M., Nedospasov S., Grivennikov S., Kuprash D., 2016. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. *Pharmacology and Therapeutics*, 168: 98-112.

3. Ben-Neriah Y., Karin M., 2011. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nature Immunology*, 12(8): 715.

4. Davis J.W., Mmeje C., 2016. Advances in Prostate Cancer Diagnosis: Triggers for Prostate Biopsy. *Prostate Cancer: Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments*, DOI: 10.5772/64402.

5. Fattahi M.J., Jamshidi A.R., Mahmoudi M., Vojdanian M., Yekaninejad M.S., Jafarnezhad-Ansariha F., Ahmadi H., Rehm B.H., Matsuo H., Cuzzocrea S. 2018. Evaluation of the efficacy and safety of β-d-mannuronic acid in patients with ankylosing spondylitis: A 12-week randomized, placebo-controlled, phase I/II clinical trial. *International immunopharmacology*, 54: 112-117.

6. Gambara G., De Cesaris P., De Nunzio C., Ziparo E., Tubaro A., Filippini A., Riccioli A., 2013. Toll-like receptors in prostate infection and cancer between bench and bedside. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(6): 713-722.

7. Hosseini S., Abdollahi M., Azizi G., Fattahi M. J., Rastkari N., Zavareh F. T., Aghazadeh Z., Mirshafiey A., 2017. Anti-aging effects of M2000 (β-D-mannuronic acid) as a novel immunosuppressive drug on the enzymatic and non-enzymatic oxidative stress parameters in an experimental model. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(3): 249-255.

Jafarnezhad-Ansariha F., Barati A., Mirshafiey A., 2017. The potent suppressive effect of β-d-mannuronic acid (M2000) on molecular expression of the TLR/NF-kB signaling pathway in ankylosing spondylitis patients. *International immunopharmacology*, 52: 191-196.

16. Schatten H. 2018. Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*, pp. 1-14.

17. Sfanos K.S., Isaacs W.B., De Marzo A.M., 2013. Infections and inflammation in prostate cancer. *Americn Journal of Clinical and Experimental Urology*, 1(1): 3-11.

18. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. 2014. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11): 2563-2582.

19. Vandercappellen J., Van Damme J., Struyf S., 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Letters*, 267(2): 226-244.

20. Wang N., Zhou R., Wang C., Guo X., Chen Z., Yang S., Li Y., 2012. T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis based on 42 case–control studies. *Molecular Biology Reports*, 39(3): 2831-2841.

8. Jelińska M., Skrajnowska D., Wrzosek M., Domanska K., Bielecki W., Zawistowska M., Korczak B. B., 2020. Inflammation factors and element supplementation in cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 59: 126450.

9. Karin M., Ben-Neriah Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Annual review of immunology*, 18(1): 621-663.

10. Masferrer J.L., Leahy K.M., Koki A.T., Zweifel B.S., Settle S. L., Woerner B.M., Edwards D.A., Flickinger A.G., Moore R.J., Seibert K., 2000. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research*, 60(5): 1306-1311.

11. Mirshafiey A., 2017. Pharmaceutical use of beta-D-mannuronic acid. EP067919.

12. Mirshafiey A., Cuzzocrea S., Rehm B., Matsuo H., 2005. M2000: a revolution in pharmacology. *Medical science monitor*, 11(8): PI53-PI63.

13. Moossavi M., Parsamanesh N., Bahrami A., Atkin S. L., Sahebkar A., 2018. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Molecular cancer*, 17(1): 158.

14. Pihan G.A., Wallace J., Zhou Y., Doxsey S.J. 2003. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Reserch*, 63(6): 1398-1404.

15. Roozbehkia M., Mahmoudi M., Aletaha S., Rezaei N., Fattahi M. J.,