مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و دوم- پائیز۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی بیان ژن survivine در لاین سلولی DU145 سرطان پروستات تیمار شده با قارچ کمبوجا

زهرا نایب شعبانی، سعید ذاکر بستان آباد*، مسعود صالحی پور

گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پروستات دومین بدخیمی رایج در مردان است. در مطالعه حاضر به بررسی اثر عصاره کمبوجا بر لاین سلولی DU145 سرطان پروستات و تغییر بیان ژن *Survivine* در سلول‌های سرطانی پرداخته شده است که این ژن یکی از ژن های درگیر در مسیر مهار آپوپتوز است.

مواد و روش‌ها: به این منظور عصاره قارچ کمبوجا بر لاین سلولی مذکور اثر داده شد و میزان میرایی سلول با روش MTT و تغییر بیان ژن *Survivine* نیز با استفاده از Real Time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: سلول‌های تیمار شده با این عصاره در بررسی MTT کاهش معنادار تعداد سلول پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد و هم‌چنین بر بیان ژن *Survivine* نیز اثر کاهنده داشت که این اثر با افزایش غلظت و زمان بیشتر می‌شد. بیش‌ترین کاهش بیان در غلظت ۷۵٪ از عصاره در ۷۲ ساعت پس از تیمار مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره کمبوجا با تأثیر بر ژن‌ها اصلی مسیر آپوپتوز باعث کاهش میزان تقسیم سلولی می‌کنند و این کاهش باعث عدم توسعه بافت سرطانی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، کمبوجا ، DU145

مقدمه

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌های مردان و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان (بعد از سرطان ریه) در جمعیت مردان است. در ایران شیوع سرطان پروستات در پنج استان ایران، بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۰، ۵/۱ در هر صد هزار نفر در سال بیان شده است و این در حالی است که سیستم ثبت سرطان همه موارد را ثبت نکرده و به‌عبارتی مقادیر گزارش شده از آمارهای واقعی کم‌تر بوده است سرطان پروستات در ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه، در حال افزایش است (۱۵) و هشتمین علت مرگ در اثر سرطان در ایران است (۷). این سرطان در ایران از گذشته تاکنون افزایش چشم‌گیری داشته به‌طوری‌که در سال ۱۳۶۵ بر طبق گزارش اداره کل مبارزه با بیماری‌های غیرواگیر مرکز مبارزه با سرطان، جزء سرطان‌های غیرشایع و با ۱/۶٪ کل سرطان‌های کشور در رده ۱۳ بوده است و در سال ۸۴ با شامل شدن ۸/۶ کل سرطان‌های کشور به رده چهارم رسیده است و در حال حاضر در رده سوم سرطان‌های شایع در مردان قرار دارد (۳). این روند رو به افزایش در تمام استان‌های کشور مشاهده می شود ولی در برخی از استان‌ها مانند تهران و اصفهان این روند از سرعت بسیار بالاتری نسبت به استان‌های دیگر مانند سیستان و بلوچستان و قم برخوردار است (۸). لذا با توجه به روند افزایشی این سرطان مطالعه در زمینه تشخیص زود هنگام بیماری، استفاده از روش‌های درمانی مؤثر

* **نویسنده مسئول :**
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۹

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

بسیار حائز اهمیت است. متأسفانه روش‌های درمانی مرسوم نظیر هورمون درمانی باعث ابقای سلول‌های سرطانی غیر وابسته به آندروژن می‌شود (۴). یکی از مکانیسم‌های ایجاد کننده تومور برهم خوردن تعادل بین تکثیر و آپوپتوز طبیعی سلولی است. خانواده Bcl- 2 و خانواده IAP به عنوان مهم-ترین گروه‌های تنظیمی است (۵). سورویوین یکی از اعضای خانواده IAP ها است که در مهار آپوپتوز و تنظیم تقسیم سلولی نقش دارد (۱).گرچه مکانیسم مهار آپوپتوز توسط این پروتئین هنوز به‌صورت کامل شناسایی نشده است اما مشاهده شده است که اتصال مستقیم و غیرمستقیم پروتئین سورویوین به افکتور کاسپاز باعث مهار آپوپتوز می‌شود. برخی از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که سورویوین به کاسپاز ۹ متصل می‌شود و فعالیت این کاسپاز را مهار می‌کند. مکانیسم پیشنهادی در مهار کاسپاز ۹ توسط سوروین، اتصال پروتئین[1] HBXIP به کاسپاز ۹ است و تصور می شود که سایر XIAP[2]هایی که دارای دمین BIR هستند همراه با سوروین در مهار عملکرد کاسپاز ۹ نقش دارند.

در مکانیسمی پیشنهادی دیگر که سوروین باعث مهار مسیر داخلی آپوپتوز می‌شود، سورویوین به پروتئین پروآپوپتوتیک SMAC/DIABLO[3] متصل می‌شود و باعث مهار این مسیر از آپوپتوز می‌شود (۱۶). این ژن در اکثر بدخیمی‌های انسان بیان شده اما به‌ندرت در بافت‌های نرمال بیان می‌گردد. بیان سورویوین در سرطان نه تنها باعث مهار آپپتوز و کاهش مرگ سلولی می‌شود بلکه باعث مقاومت به شیمی درمانی نیز می-شود. از این رو سورویوین یکی از ژن‌های هدف در درمان سرطان است. این ژن در سلول‌های بنیادی نیز بیان می‌شود اما هنوز نقش آن در این سلول ها مشخص نشده است . اما آن‌چه مسلم است این است که این پروتئین دارای دامنه وسیعی از نقش‌های متفاوت است (۲). این واقعیت سوروایوین را به‌عنوان مارکر شاخص در درمان هدفمند سرطان مطرح می‌کند. با این تفکر، جستجوبرای عوامل درمانی جدید با خواص ضد بیان ژن سوروایوین ممکن است درمان سرطان را با حداقل سمیت در بافت‌های طبیعی فراهم نماید. یکی از عصاره‌های طبیعی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است قارچ کمبوجا است. کمبوجا از هم‌زیستی انواعی از مخمرها و باکتری‌ها است. نوشابه‌ای که از تخمیر چای توسط قارچ به‌دست می‌آید دارای دسته‌ای مواد شیمیایی موسوم به پلی‌فنول‌ها است که آنتی‌اکسیدان هستند یعنی می‌توانند ریشه‌های آزاد شیمیایی موجود در سلول‌ها را که سرطان‌زا هستند به خود جذب کنند (۲۴) لذا در مطالعه حاضر اثر این عصاره بر لاین سلولی DU145 و بیان *Survivine* در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

لاین سلولی DU145 از انستیتوپاستور تهران خریداری شد و قارچ کمبوجا نیز بر اساس پروتوکل ارائه شده توسط Jayabalan و همکارانش تهیه شد (۱۰). جهت انجام MTT ابتدا تعداد مناسبی سلول (بیش‌تر ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) در هر یک از چاهک‌ها کشت داده شد و به سلول‌ها اجازه داده شد که به کف پلیت بچسبند و به‌حالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شده و دوزهای ۲۵٪[4]، ۵۰٪، ۷۵٪ از عصاره کمبوجیا به چاهک‌های تست اضافه شد و پلیت را تا زمان مورد نیاز جهت تأثیر ماده مورد نظر، انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی را دور ریخته شده به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه شد و به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور CO_2 در ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال-های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به‌حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

از طرف دیگر میزان بیان ژن *Survivine* نیز در دوز های ۲۵٪ و ۷۵٪ ارزیابی شد. به این منظور ابتدا با استفاده از کیت تاکارا از سلول‌ها RNA استخراج گردید و سپس سنتز cDNA انجام شد. کیفیت cDNA با روش اسپکتوفتومتری ارزیابی شد و نمونه‌های با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه مورد به‌عنوان نمونه در روش Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. برنامه Real Time PCR و پرایمرها در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از MTT با استفاده از تست آماری ANOVA و نتایج حاصل از Real Time PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ارزیابی گردید.

[1] hepatitis B X-interaction protein
[2] X-linked IAP
[3]
[4] ۲۵٪ عصاره+ ۷۵٪ محیط کشت

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

نتایج

نتایج حاصل از روش MTT در جدول۳ و شکل۱ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج مشخص شد که کم‌ترین میزان جذب در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۷۵٪ مشاهده شده است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نیز نشان داد که تعداد سلول‌ها بعد از ۱۲ ساعت کاهش می‌یابد اما این کاهش تا ۴۸ ساعت معنادار نبود و کاهش معنادار تعداد سلول از ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره کمبوجا مشاهده شد (pvalue<0,05) (جدول۳). آزمون TUKEY نیز نشان داد که بین تعداد سلول در غلظت تیماری ۵۰٪ و ۲۵٪ اختلاف معنادار وجود ندارد اما تعداد سلول‌ها در تیمار ۲۵٪ به‌صورت معنادار نسبت به کنترل کم‌تر و نسبت به تیمار ۷۵٪ بیش‌تر است و افزایش غلظت داروی تیماری و افزایش غلظت آن می‌تواند باعث افزایش القای مرگ سلولی شود.

نتایج حاصل از Real Time PCR نشان داد که بیان ژن در نمونه‌های تیماری نسبت به نمونه کنترل کاهش داشته است که تغییر زمان و غلظت نیز باعث تغییر بیان ژن می‌شود. کاهش بیان بین ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تفاوت چندانی باهم ندارد اما بعد از ۷۲ ساعت تغییر بیان چشم‌گیر است و بیش‌ترین کاهش بیان در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۷۵٪ از عصاره کمبوجا مشاهده شد (جدول۴).

بحث

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین انواع سرطان و دومین علت مرگ و میر در مردان آمریکایی است و شیوع آن رابطه مستقیمی با افزایش سن دارد (۱۵). سرطان پروستات در ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه، در حال افزایش است (۷) عدم تعادی بین تکثیر و آپوپتوز طبیعی سلولی می‌تواند منجر به تکثیر کنترل نشده سلول شده و در نهایت منجر به سرطان شود. چنان‌چه فعالیت آپوپتوزی کاهش یابد، سلول به سمت سرطانی شدن پیش می‌رود (۷)، لذا پژوهشگران در جهت درمان سرطان و در راستای فعال کردن ساز و کار مرگ برنامه ریزی شده در تلاش هستند.

از طرفی استفاده از درمان‌های جایگزین در طب سنتی از جمله استفاده از گیاهان دارویی در کشورهای مختلف برای درمان بیماری‌های مختلف از گذشته در بین مردم رایج بوده است (۲۳). قارچ Kombucha هم‌خانواده انواعی از مخمرها و باکتری‌ها است (۹). محققان بسیاری درباره فواید Kombucha به بررسی پرداخته‌اند و فواید بسیاری برای این ترکیب عنوان کرده‌اند که عبارت است از: خاصیت آنتی‌بیوتیکی، ضدسرطانی، بهبود رفلاکس مری به معده، تحریک سیستم ایمنی، افزایش فعالیت و سم‌زدایی و تصفیه خون، کنترل متابولیسم بدن، کلسترول، التیام زخم و .... (۱۸). گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده از این قارچ برای از بین بردن سلول‌های سرطانی بسیار مؤثر بوده است (۲۱). مطالعه‌های in vitro بر روی لاین‌های سلولی مربوط به سرطان‌های کولون، ریه، ملانوما و سینه و لوکومی انجام شده است و نتایج آن‌ها مکمل یکدیگر بوده‌اند (۶). برخی مطالعه‌ها نیز بر روی حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به سرطان سینه، کولون و ریه انجام شده است و تأیید کننده عملکرد ضدسرطانی این ترکیب بوده است (۱۷). در مطالعه حاضر اثر عصاره کمبوجا بر لاین سلولی DU145 نشان دهنده کاهش معنادار تعداد سلول‌های تیماری نسبت به سلول‌های کنترل در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از تیمار بود. Jaybalan و همکارانش اثر سیتوتوکسیک غلظت های مختلف فراکشن‌های مختلف Kombucha را بر روی رده‌های سلولی A549، U2OS و 786-O که به‌ترتیب رده‌های سلولی سرطان‌های ریه، استخوان و کلیوی هستند مورد بررسی قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد فراکشن‌های مختلف Kombucha بر روی این رده‌های سلولی باعث کاهش قدرت تهاجمی سلول‌ها و افزایش میزان مرگ سلول‌ها می‌گردد (۱۱) و در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان دادند که عمل آنتی‌اکسیدانی Kombucha وابسته به زمان مواجه است و مصرف بیش از حد آن برای کاهش زمان مواجهه با توجه تجمع ارگانیک اسیدها در آن منجر به آسیب‌های مختلف می‌گردد (۱۲). در مطالعه‌ای مشابه با این مطالعه، میزان زنده بودن، قدرت تهاجمی و بیان بعضی از ژن‌های مربوط به رده سلولی سرطان پروستات بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف کاکبوجیا توسط Srihari و همکاران مورد بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعه مشابه نتایج این مطالعه بود که نشان داد تیمار با Kombucha منجر به کاهش تعداد سلول‌های زنده بعد از تیمار گردید و از طرفی میزان قدرت تهاجمی سلول‌ها بعد از تیمار با Kombucha کاهش پیدا کرد. علاوه‌برا این تیمار با این گیاه دارویی منجر به کاهش بیان ژن‌های MMP و HIF-1 و دیگر ژن‌های کمک‌کننده به کتابولیسم سلول سرطانی گردید (۲۰) نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی با استفاده از غلظت‌های مختلف Kombucha باعث کاهش بیان ژن survivin در گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل بود و بیش‌ترین کاهش بیان ژن در ۷۲ ساعت پس از تیمار در غلظت ۷۵٪ از عصاره Kombucha مشاهده شد. در مطالعه-

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

های اخیر گزارش شده است که *survivin* بـه‌عنـوان یـک ژن مؤثر در ایجاد تومور در بسیاری از تومورها افزایش بیان داشـته است،

در مطالعه لاریجـانی و همکـاران ، ارزش بـالینی رنـگ‌آمیـزی سوروایوین برای تفکیک آدنوم از کارسینوم فولیکولار تیروئیـد مورد ارزیابی قرار گرفته است. این مطالعه بـه روش توصـیفی– تحلیلی مقطعی انجام شد. جمعیـت آمـاری نمونـه بافـت‌هـای بیماران جراحی شده به‌علت آدنـوم و کارسـینوم فولیکـولار در بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بودند که کلیه نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیـزی ایمونوهیستوشـیمی سـوروایوین مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد کـه بیـان سـوروایوین در بیماران با تشخیص کارسینوم فولیکولار در مقایسه با آدنوم فولیکولار بیش‌تر بود (۱۴).

در مطالعه‌ای که توسط Kishi و همکاران انجـام شـده اسـت، نتـایج نشـان داد کـه شـدت بیـان ژن Survivin در سـرطان پروستات افزایش یافته و بـا پیشـرفت و هـم‌چنـین بـا قـدرت متاسـتازی و تهـاجمی سـرطان مـرتبط اسـت (۱۳). Chen و همکارانش نیز در مطالعه دیگر نشان دادند که پلـی مورفیسـم در ژن *Survivin* با افزایش خطر سـرطان پروسـتات مـرتبط است (۲۲). افزایش بیان *Survivin* باعث مهار مسیر داخلـی و خارجی آپوپتوز می‌شود و کاهش بیان این ژن باعث القا مـرگ سلولی و کاهش تقسیم‌هـای سـلولی مـی‌شـود. بـا ایـن حـال مکانیسم مهار آپوپتوز توسط این پروتئین هنوز به‌صورت کامل شناسایی نشده است اما مشاهده شده است که اتصال مسـتقیم و غیرمستقیم پروتئین *Survivin* به افکتور کاسپاز باعث مهـار آپوپتوز می‌شود (۱۹).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کمبوجا بـا کـاهش بیـان ژن *Survivin* باعث افزایش مرگ سلولی در سـلول‌هـای سـرطان پروستات شده است که این اثر می‌تواند ناشی از کـاهش بیـان پروتئین *Survivin* و در نتیجه افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها و القای مرگ سلولی در آن‌ها باشد. بنابراین بـا تـأثیری کـه از Kombucha بر القای مرگ سلولی در ایـن مطالعـه مشـاهده شد و هم‌چنین افزایش بیان ژن *Survivin* در اثر تیمـار لایـن سلولی سرطان پروستات با عصاره کمبوجا، می‌توان امیدوار بود که در آینده با مطالعات بیشتر این عصاره را به‌عنوان یک گیـاه دارویی در درمان سرطان و القـا مـرگ سـلولی در سـلول‌هـای سرطانی مورد استفاده قرار داد.

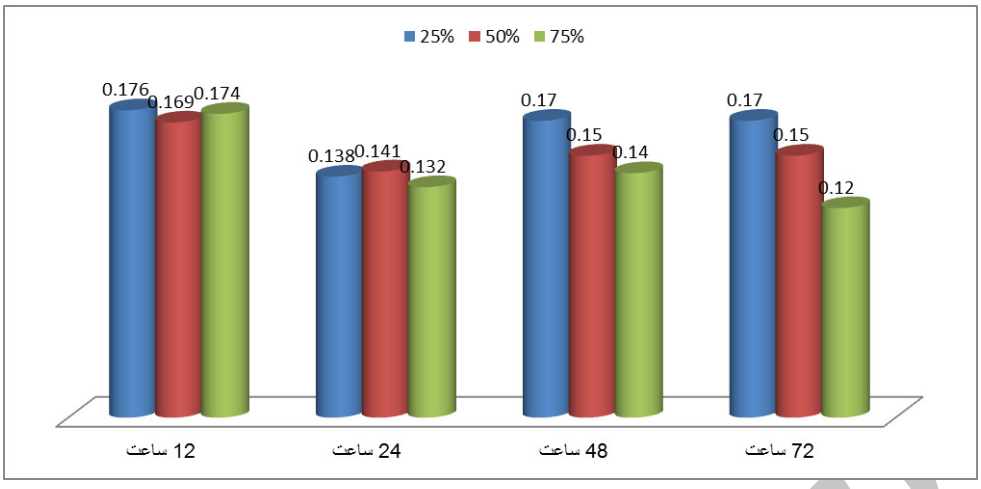
سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

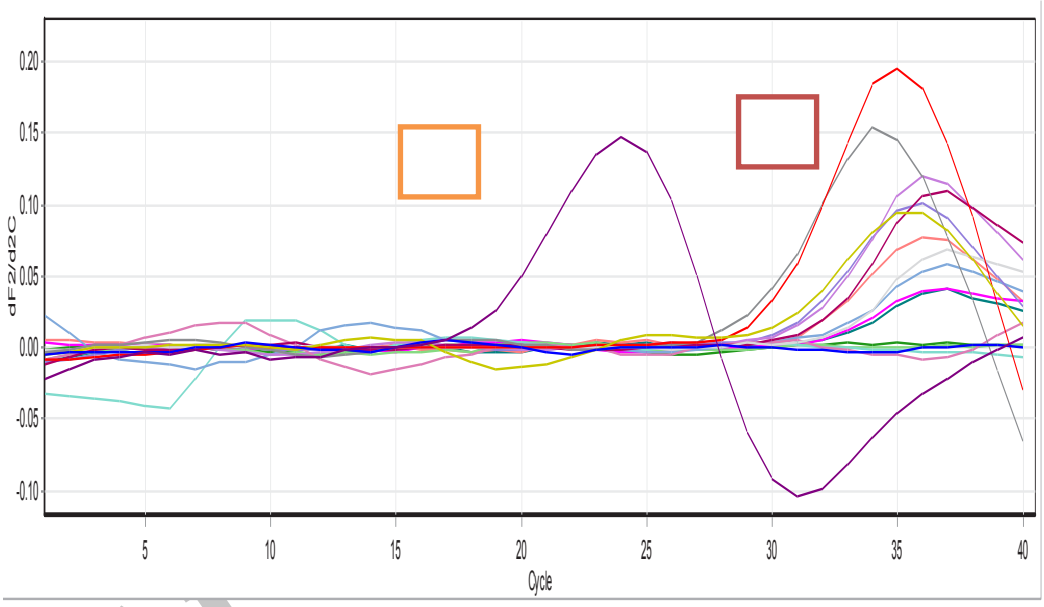
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019



شکل۱: نتایج حاصل از MTT

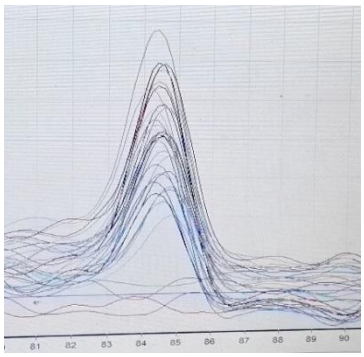


شکل۲- منحنی تکثیر Real Time PCR برای ژن *survivin* و *GAPDH*

۱: بیان ژن *survivin* در لاین سلولی DU-145 تیمار نشده

۲: منحنی تکثیر ژن *survivin* در حالات مختلف تیمار

۳: منحنی تکثیر ژن کنترل داخلی *GAPDH*



شکل۳- منحنی ذوب

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

جدول۱: توالی پرایمرها

پرایمر	توالی پرایمر	طول
Forward-sur	5'- TGAAGTCTGGCGTAAGATG-3´	۱۹۶
Reverse-sur	5'- GGACGACGATGAAAAACTG-3´	
Forward-GAPDH	5'-GGTCATCATCTCTGCCCCCT-3´	۲۷۶
Reverse-GAPDH	5'-AGGCAGGGATGATGTTCTGG-3´	

جدول۲: برنامه زمانی انجام Real Time PCR

مرحله انجام	زمان انکوباسیون/ دمای انکوباسیون	تعداد سیکل
دناتورسیون اولیه	۹۵ درجه/۳۰ ثانیه	۱ سیکل
دناتوراسیون	۹۵ درجه/ ۵ ثانیه	۴۰ سیکل
اتصال پرایمر و طویل سازی رشته	۵۶ درجه/۳۵ ثانیه	

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

جدول۳: نتایج آنالیز آماری ANOVA

12h	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	.156	.923
Within Groups	.002	8	.000		
24h	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	3	.002	1.761	.232
Within Groups	.008	8	.001		
48h	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.037	3	.012	20.240	.000
Within Groups	.005	8	.001		
72h	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	3	.003	13.277	.002
Within Groups	.002	8	.000		
Total	.010	11			

جدول۴: نتایج آنالیز داده های Real Time PCR

	ΔCT_{Target}	$2^{-\Delta ct}$	$2^{-\Delta cttarget}/2^{-\Delta ctccontrol}$	**Fold change**
25%mg/l in 24h	۲/۸	۶/۹۶	۰/۵	**کاهش ۲ برابر**
25%mg/l in 48h	۰/۲	۱/۱۴	۰/۰۸	**کاهش ۱۲,۵ برابر**
25%mg/l 72h	۰/۱۸	۱/۱۳	۰/۰۸	**کاهش۱۲,۵ برابر**
75%mg/l 24h	-۰/۶	۰/۶۶	۰/۰۴	**کاهش ۲۵ برابر**
75%mg/l in 48h	-۰/۶	۰/۶۶	۰/۰۴	**کاهش ۲۵برابر**
75%mg/l In 72h	-۰/۹	۰/۵۳	۰/۰۳	**کاهش ۳۳ برابر**
control	-۳/۸	۱۳/۹۲	۱	**۱**

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

منابع

1.Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. Progress in cell cycle research. 2003;5:447-52.

2. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nature medicine. 1997 Aug 1;3(8):917-21.

3. Azizi F, Hatami H, Janghorbani M. Epidemiology and control of common diseases in Iran. Tehran: Eshtiagh Publications. 2000:602-16.

4. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. Nature medicine. 1999 Mar;5(3):280.

5. Dlamini, Z. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. Pharmacology & therapeutics. 2004, 31;101(1):1-5.

6. Hauser SP. Dr. Sklenar's Kombucha mushroom infusion--a biological cancer therapy. Documentation No. 18. Schweizerische Rundschau fur Medizin Praxis= Revue suisse de medecine Praxis. 1990 Feb;79(9):243-6.

7. Hosseini M, Jahani Y, MAHMOUDI M, Eshraghian MR, Yahyapour Y, KESHTKAR AA. The assessment of risk factors for prostate cancer in Mazandaran province, Iran.

8. Hoda S, Aliee A, Shakiba MA, Odi M, Ghasemi Poor M, Poor Rasooli Z. A study of frequency of cancerous organs in Guilan province (1999-2000). Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2003 Jul 15;12(46):84-92.

9. Ichim, G., & Tait, S. W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nature Reviews Cancer.2016, 16, 539-548.

10. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. Food Chemistry. 2007 Jan 1;102(1):392-8.

11. Jayabalan R, Chen PN, Hsieh YS, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, et al. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidine) malonate and vitexin.

12. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2014 Jul;13(4):538-50.

13. Kishi H, Igawa M, Kikuno N, Yoshino T, Urakami S, Shiina H. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. The Journal of urology. 2004 May 1;171(5):1855-60.

14. Lariyani, A. Evaluation of the relationship between Survivin expression in adenoma and follicular carcinoma of the thyroid. J. Sabzevar University of Medical Sciences, 2005, 14 (1): 32-37.

15. Malekzadeh, R. Incidences of differnet cancers in Iran. In The 16th International Congress of Geographic. Medicine Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 2003, (pp. 1-4).

16. Marusawa, H., S. i. Matsuzawa, K. Welsh et al. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. The EMBO journal, 22 (11), 2729-2740.

www.SID.ir