

Effect of *Helicobacter pylori*, black tea and sodium bicarbonate on iron metabolism and MDCK cell survival

D. Hamed Asl¹, B. Rahmani¹, T. Naserpour Farivar², F. Hajmanochehri³, A. Peymani²

¹ Department of Molecular Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

² Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

³ Department of Pathology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Corresponding Address: Amir Peymani, Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Email: a.peymani@gmail.com. Tel: +98-28-33337006

Received: 26 Jul 2018; Accepted: 11 Oct 2018

*Abstract

Background: Iron deficiency anemia is the most common nutritional disorder in the world. Diet and *Helicobacter pylori* infection are among the main causes of this disorder.

Objective: In this study, the effect of black tea extract and sodium bicarbonate with *Helicobacter pylori* on the genes involved in iron absorption and storage, as well as cell proliferation, were studied.

Methods: Simultaneous cultivation of MDCK and *Helicobacter pylori* cell lines was performed at concentrations of 10, 20, 40 and 80 µg/ml of tea extract and 30, 40, 60 and 100 mM sodium bicarbonate at 24 and 48 hours. The effect of treatment on cell survival was investigated by trypan blue staining and expression of *MYC*, *TFRC*, *FTH1*, *IRP2*, *IRP1*, and *NDRG1* genes by real-time PCR and analyzed by ANOVA and independent T-test.

Findings: There was no significant change in the expression of the genes involved in iron metabolism under the influence of tea, sodium bicarbonate and *Helicobacter pylori* treatment in MDCK cell line. Upregulation *MYC* gene expression was observed in the presence of *Helicobacter pylori* after 24 hours treatment with tea extract, and sodium bicarbonate, and in the absence of *Helicobacter pylori* upregulation with tea extract after 48 hours ($P<0.05$). Also upregulation *NDRG1* gene expression was seen after tea extract treatment of cells with or without *Helicobacter pylori* in both 24 and 48 h ($P<0.05$).

Conclusion: Sodium bicarbonate and tea each one alone didn't not influence iron status. This study suggests that reduction of tea intake could be served as a risk prevention strategy.

Keywords: Iron, Tea, Sodium bicarbonate, *Helicobacter pylori*

Citation: Hamed Asl D, Rahmani B, Naserpour Farivar T, Hajmanochehri F, Peymani A. Effect of *Helicobacter pylori*, black tea and sodium bicarbonate on iron metabolism and MDCK cell survival. J Qazvin Univ Med Sci 2018; 22(5): 36-43.

بررسی تأثیر هلیکوباکتر پیلوری، چای سیاه و جوش شیرین بر روی متابولیسم آهن و بقای رده سلولی MDCK

داریوش حامدی اصل^۱، دکتر بابک رحمانی^۱، دکتر تقی ناصرپور فریور^۲، دکتر فاطمه حاج منوچهری^۳، دکتر امیر پیمانی^۲

^۱ گروه پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
^۲ مرکز تحقیقات میکروبی شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
^۳ گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

آدرس نویسنده مسؤل: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات میکروبی شناسی پزشکی، تلفن ۰۲۸ - ۳۳۳۳۷۰۰۶
 تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۹

*چکیده

زمینه: کم خونی فقر آهن شایع ترین اختلال تغذیه ای در جهان می باشد. رژیم غذایی و عفونت هلیکوباکتر پیلوری از جمله عوامل مطرح در بروز این اختلال می باشند.

هدف: در این مطالعه تأثیر عصاره چای سیاه و جوش شیرین در کنار عفونت هلیکوباکتر پیلوری بر روی ژن های دخیل در جذب و ذخیره آهن و تکثیر سلولی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: کشت همزمان رده سلولی MDCK و هلیکوباکتر پیلوری تحت تأثیر غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره چای و ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میلی مولار جوش شیرین در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت. تأثیر تیمار بر بقای سلولی توسط رنگ آمیزی تریپان بلو و بیان ژن های IRP1، IRP2، FTH1، TFRC، MYV و NDRG1 با روش Real-time PCR بررسی و با آزمون آماری آنووا و نمونه های مستقل تی تحلیل گردید.

یافته ها: تغییر معناداری از بیان ژن های دخیل در متابولیسم آهن تحت تأثیر تیمار چای، جوش شیرین و هلیکوباکتر پیلوری در رده سلولی MDCK مشاهده نشد. افزایش بیان ژن MYC تحت تأثیر تیمار چای و بی کرینات در حضور هلیکوباکتر پیلوری در زمان ۲۴ ساعت و تحت تأثیر عصاره چای در زمان ۴۸ ساعت بدون حضور هلیکوباکتر پیلوری مشاهده شد ($P < 0/05$). همچنین افزایش بیان ژن NDRG1 با و بدون حضور هلیکوباکتر پیلوری در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار عصاره چای، مشاهده شد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که بی کرینات سدیم و چای به تنهایی تأثیری بر وضعیت آهن ندارند. با توجه به افزایش بیان ژن MYC تحت تأثیر عصاره چای، کاهش مصرف چای به عنوان یک راهکار پیشگیری از خطر بدخیمی پیشنهاد می شود.

کلیدواژه ها: آهن، چای، جوش شیرین، هلیکوباکتر پیلوری

*مقدمه

متابولیسم آهن انسان مجموعه ای از فرایندهای مولکولی است که هوموستاز انسان را در سطح سلولی و سیستمیک حفظ می کند.^(۱) جذب آهن عامل اصلی در تعادل فیزیولوژیک آهن است و شاخص های میزبان و رژیم غذایی نقش مهمی در این موضوع دارند.^(۲) چای و جوش شیرین (بی کرینات سدیم) جزء رژیم غذایی بسیاری از افراد و از عوامل شناخته شده مؤثر بر جذب آهن می باشند و پلی فنول های موجود در چای سیاه و کاهش اسیدیته معده به واسطه جوش شیرین مانع از جذب مؤثر آهن می شوند.^(۳) عفونت باکتری هلیکوباکتر پیلوری جنبه های گوناگونی از سلامت انسان را از زخم معده گرفته تا کم خونی فقر آهن و دیگر بیماری ها تحت تأثیر قرار می دهد.^(۴) کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در مخاط معده و التهاب ناشی از آن منجر به کاهش جذب آهن و ایجاد کم خونی فقر آهن در مبتلایان می شود.^(۵) از طرف دیگر کمبود آهن در محیط معده منجر به دست اندازی

متابولیسم آهن انسان مجموعه ای از فرایندهای مولکولی است که هوموستاز انسان را در سطح سلولی و سیستمیک حفظ می کند.^(۱) جذب آهن عامل اصلی در تعادل فیزیولوژیک آهن است و شاخص های میزبان و رژیم غذایی نقش مهمی در این موضوع دارند.^(۲) چای و جوش شیرین (بی کرینات سدیم) جزء رژیم غذایی بسیاری از افراد و از عوامل شناخته شده مؤثر بر جذب آهن می باشند و پلی فنول های موجود در چای سیاه و کاهش

* مواد و روش‌ها:

رده سلولی MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور) تهیه و در محیط کشت RPMI (Gibco) به اضافه ۱۰ درصد سرم گوساله FBS (Gibco) و ۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵۰ میکروگرم در واحد استرپتومایسین در انکوباتور (دما ۳۷ درجه سلیسیوس، رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد) تا رسیدن به رشد مطلوب کشت داده شد. سلول‌ها به تعداد 3×10^3 در پلیت‌های ۶ خانه جهت هماهنگ‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در محیط فاقد سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. تیمار با استفاده از ۳ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI حاوی ۲۳ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم، FBS به میزان ۵ درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آهن، عصاره چای (Sigma-T5550) در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بی‌کربنات سدیم (Sigma-S5761) مجموعاً در غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار انجام گرفت. کشت سلول جهت تأیید عدم وجود آلودگی با مایکوپلازما توسط PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه منفی بود. جهت تعیین میزان بقای سلول‌ها در حین تیمار از تریپان بلو ۰/۴ درصد استفاده شد.

با توجه به این‌که تأثیر بی‌کربنات از طریق تغییرات pH بر سلول‌ها و در نتیجه تغییرات بیان ژن اعمال می‌گردد، pH تمام تیمارهای چای و جوش شیرین با استفاده از pH متر (Metrohm-744) در دمای ۳۷ درجه داخل انکوباتور دی‌اکسید کربن انجام گرفت.

سویه هلیکوباکتریلوری ATCC 26695 از آرشیو گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین استفاده شد. برای کشت از محیط کلمبیا آگار به اضافه ۱۰ درصد خون گوسفند، ۱ درصد عصاره مخمر، آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، تریمتوپریم ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و وانکومایسین به میزان ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت

هلیکوباکتریلوری به سلول‌های معده جهت به‌دست آوردن آهن مورد نیاز خود می‌شود که این امر بر شدت التهاب ناشی از عفونت می‌افزاید.^(۷)

متابولیسم آهن توسط مجموعه‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژن‌های

(Iron regulatory protein 1; IRP1), (Iron regulatory protein 2; IRP2), (Transferrin receptor chain; TFRC) و (Ferritin transferrin heavy1; FTH1) اشاره کرد.^(۸)

هر کدام از این ژن‌ها به‌نوبه خود عملکردهای دیگری نیز در فرایندهای سلولی دارند و کاهش یا افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند مسائل متفاوتی را ایجاد کند، به‌عنوان مثال پتانسیل سرطان‌زایی ژن IRP2.^(۹) شبکه ارتباطی ژن‌های مختلف و تأثیرهای متقابل آن‌ها بر روی یکدیگر نیز موضوع دیگری است که در نهایت هدف از این تنظیمات پیچیده، بقای جاندار است، به‌عنوان مثال میان‌کنش متابولیسم آهن و عفونت هلیکوباکتریلوری با ژن‌های NDRG1 (N-Myc downstream regulated1) به‌عنوان یک ژن مهارکننده تومور و v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene به‌عنوان یک ژن سرطان‌زا.^(۱۰، ۱۱) عفونت هلیکوباکتریلوری باعث افزایش بیان ژن MYC می‌شود و از طرف دیگر کاهش مقادیر آهن سلولی باعث افزایش بیان ژن NDRG1 و کاهش بیان ژن MYC می‌شود.^(۱۲-۱۴)

فرض ما این است، با توجه به حضور هلیکوباکتریلوری در محیط معده، عوامل تغذیه‌ای که منجر به کاهش آهن آزاد در دسترس باکتری می‌شوند، تأثیر زیادی هم بر بیماری‌زایی باکتری دارد و هم این چالش سلول‌های معده را به لحاظ ته‌اجم هلیکوباکتریلوری در فشار قرار می‌دهد. در این مطالعه سعی بر این است تا اثر چای و جوش شیرین به‌عنوان عوامل تغذیه‌ای مؤثر بر جذب آهن بر روی ژن‌های دخیل در متابولیسم آهن و تقسیم سلولی در حضور و عدم حضور هلیکوباکتریلوری بر روی سلول‌های MDCK بررسی شود.

جهت انجام PCR بیان ژن، ۱/۵ تا ۳ لاند cDNA، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر به مسترمیکس آمپلیکون (RealQ Plus 2x Master Mix Green) اضافه گردید. چرخه‌های حرارتی به ترتیب: ۹۵ درجه ۱۵ دقیقه به دنبال آن، ۴۰ چرخه ۹۵ درجه ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه انجام گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Q Series Software انجام گرفت. میزان بیان ژن براساس روش Pfaffl و با استفاده از نرم‌افزار REST (Qiagen) محاسبه شد.^(۲۰) به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و آزمون‌های آماری آنووا و نمونه‌های مستقل تی استفاده شد. سطح معنی‌دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها:

تیمار سلول‌ها با عصاره چای و بی‌کربنات سدیم در دو زمان ۲۴ ساعت (با و بدون هلیکوباکتریپلوری) و ۴۸ ساعت بدون حضور هلیکوباکتریپلوری در کنار گروه شاهد به صورت سه گانه انجام گرفت. جهت بررسی اثر شرایط اسیدی یا بازی حاصل از تیمار با عصاره چای و بی‌کربنات سدیم pH محیط کشت پس از تیمار در شرایط انکوباتور اندازه‌گیری شد. pH محیط کشت در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم، ۸/۳ و در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره چای، ۶/۵ بود (شکل ۱-الف).

تعداد سلول‌های زنده پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره چای و هلیکوباکتریپلوری 1.03×10^3 و پس از ۴۸ ساعت سلول زنده‌ای دیده نشد. تعداد سلول‌های زنده پس از ۲۴ ساعت تیمار با عصاره چای بدون حضور هلیکوباکتریپلوری 1.03×10^3 و پس از ۴۸ ساعت 1.03×10^3 بود (شکل ۱-ب). تعداد سلول‌های زنده پس از ۲۴ ساعت تیمار با بی‌کربنات سدیم و هلیکوباکتریپلوری 1.03×10^3 و پس از ۴۸ ساعت هیچ سلول زنده‌ای مشاهده نشد. تعداد سلول‌های زنده پس از ۲۴ ساعت تیمار با بی‌کربنات سدیم و بدون حضور هلیکوباکتریپلوری 1.03×10^3 و پس از ۴۸ ساعت 1.03×10^3 بود (شکل ۱-ب).

سه روز در دمای ۳۷ درجه در شرایط میکروآتروفیلیک ایجاد شده توسط دستگاه Anoxomat AN2OP کمپانی MART استفاده شد.^(۱۵) جهت کشت همزمان، رقت متناسب از باکتری با $MOI 10:1$ (نسبت باکتری به سلول) در محیط کشت RPMI تهیه شد. جهت استخراج RNA از کیت High Pure RNA Paraffin kit (شرکت Roche) و سنتز cDNA توسط کیت REVERTA-L (شرکت AmpliSens) طبق دستورالعمل انجام گرفت.

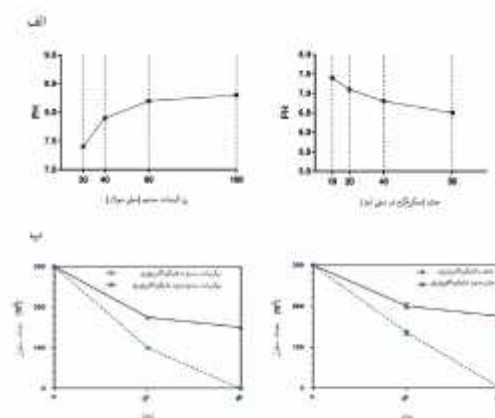
Real-time PCR توسط دستگاه Rotor-Gene Q (Qiagen) انجام گرفت. ژن‌های 18S و rRNA به عنوان استاندارد داخلی و ژن‌های NDRG1، MYC، TFRC، FTH1، JRP2، JRP1 بررسی اثر تیمار چای و بی‌کربنات بر روی متابولیسم و تکثیر سلول‌های MDCK انجام گرفت. پرایمرهای این مطالعه براساس ژنوم *Canis lupus familiaris* توسط نرم‌افزار IDT Primer Quest software (Integrated DNA Technologies, Inc) شدند که لیست آن‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است. اختصاصی بودن تشخیص پرایمرها با استفاده از (Basic Local Alignment Search; BLAST) GenBank database (NCBI) Tool تعیین شد و هیچ توالی که با این آزمون مداخله کند شناسایی نشد.

جدول ۱- نام، توالی و اندازه پرایمرهای مورد بررسی

ژن	توالی پرایمر	طول قطعه	مرجع
18S - NM_001048082.1	CTAGTGATCCCTGAGAAGTTCC ATGTCTGCTTTCCTCAATACC	143 bp	(۱۶)
ACTB - NM_001195845.2	GGCATCCTGACCTGAAGTA GGGGTGTGAAAGTCTCGAA	203 bp	(۱۷)
TFRC - NM_001003111.1	CACTGAATGGCTAGAGGGATAC GCAGAAACCTTGAAGTTGCTG	105 bp	این مطالعه
FTH1 - NM_001193656.1	GTCTTACGTCTACTTGTCCATG TTTCTCAGCATGTTCCCTCTC	115 bp	این مطالعه
IRP1 - NM_001320941.1	CTACAGGCTCTTGGGAAATC ACTCCACAAACTGCCTACTAC	107 bp	این مطالعه
IRP2 - NC_000915.1	CAACCAGTGCCTGAACCTG ATGAGCCATTCCAGTTCAG	144 bp	این مطالعه
MYC - NM_001003246.2	TGCCTATTTGGGAAGACAC AAGCTGACGTTGAGAGGCAT	141 bp	(۱۸)
NDRG1 - NC_000915.1	AGGGCTGCTCTTATCAAC GACCACCTCCACGTTGTCT	152 bp	(۱۹)

هلیکوباکتریپلوری و در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدون حضور هلیکوباکتریپلوری در زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد ($P < 0.05$)؛ همچنین افزایش بیان ژن NDRG1 در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره چای بدون حضور هلیکوباکتریپلوری، غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره چای با حضور هلیکوباکتریپلوری در زمان ۲۴ ساعت و همچنین در تمامی غلظت‌های عصاره چای در زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد ($P < 0.05$).

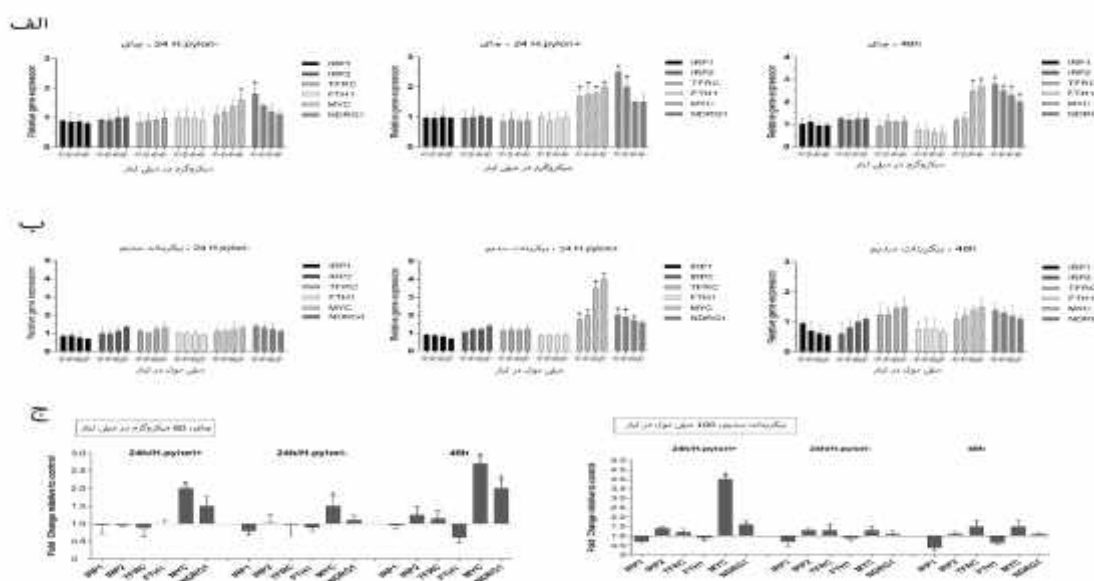
در مورد تأثیر بی‌کربنات سدیم و هلیکوباکتریپلوری بر روی متابولیسم آهن نیز در مقایسه با گروه شاهد در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییر معنی‌داری از بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم آهن با و بدون حضور هلیکوباکتریپلوری مشاهده نشد. افزایش بیان ژن MYC در تمامی غلظت‌های بی‌کربنات سدیم در حضور هلیکوباکتریپلوری و همچنین افزایش بیان ژن NDRG1 در غلظت‌های ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم با حضور هلیکوباکتریپلوری در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد ($P < 0.05$).



شکل ۱- الف: نمودار تغییرات pH در غلظت‌های مورد بررسی چای و بی‌کربنات سدیم، ب: نمودار بقای سلولی پس از تیمار با چای و بی‌کربنات سدیم

در بررسی تأثیر عصاره چای و هلیکوباکتریپلوری بر روی متابولیسم آهن در گروه تیمار با عصاره چای و هلیکوباکتریپلوری در مقایسه با گروه شاهد در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییر معناداری از بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم آهن با و بدون حضور هلیکوباکتریپلوری مشاهده نشد. افزایش بیان ژن MYC در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره چای در حضور

شکل ۲- نمودار تغییرات بیان ژن‌های IRP1, IRP2, TFRC, FTH, MYC, NDRG1 در تیمار با چای و بی‌کربنات سدیم



*** بحث و نتیجه گیری:**

ارتباط رژیم غذایی با بروز بیماری‌های مختلف همواره مطرح بوده و مواد غذایی هر کدام براساس ماهیتشان اثرهای خاص خود را بر روی سلامتی انسان می‌گذارند. این که چای و جوش شیرین تا چه حد باعث اختلال در جذب آهن می‌شوند همواره مورد مناقشه بوده و هست.^(۲۱، ۲۲) از طرف دیگر با توجه به این که عفونت هلیکوباکتریپلوری نیز به‌عنوان یکی از علل کم‌خونی فقر آهن مطرح می‌باشد،^(۲۳) در این بررسی شواهدی دال بر تأثیر این دو ماده با و بدون حضور هلیکوباکتریپلوری بر متابولیسم آهن به‌دست نیامد. به‌نظر می‌آید فرایند جذب آهن تحت تأثیر عواملی بیش از یک یا دو ماده غذایی باشد و هیچ کدام از این مواد به‌تنهایی نمی‌توانند منجر به اختلال در جذب آهن و در نهایت کم‌خونی فقر آهن شوند.^(۲۴) این که بتوان به‌طور قطع در مورد تأثیر چای و جوش شیرین بر روی جذب آهن نظر داد نیازمند مطالعه‌های بالینی بیش‌تر و طولانی است.^(۲۵)

در بررسی اثر عصاره چای و جوش شیرین بر روی ژن‌های MYC و NDRG1، نتایج مطالعه حاضر نقش هلیکوباکتریپلوری در افزایش بیان ژن MYC و سرکوب ژن NDRG1 را تأیید کرد.^(۱۲) البته نکته مهم در این بررسی، افزایش میزان بیان ژن MYC در تیمار با غلظت‌های بالای عصاره چای و موازی با آن کاهش میزان بیان ژن NDRG1 به‌عنوان یک ژن پاسخ به استرس در زمان ۴۸ ساعت بدون حضور هلیکوباکتریپلوری بود که این موضوع نیاز به بررسی بیش‌تری دارد، چرا که ژن MYC به‌عنوان یک ژن دارای عملکرد کلیدی در چرخه سلولی اهمیت زیادی در بسیاری از سرطان‌ها دارد.^(۲۶) مقاله‌های متنوعی در خصوص مصرف چای و خطر ابتلا به سرطان و نیز خواص ضدسرطان وجود دارد و البته تعدادی نیز بر عدم تأثیر چای دلالت دارد.^(۳۱-۳۷) با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعه‌های دیگر مبنی بر ارتباط این رژیم غذایی با بروز سرطان‌های مختلف از قبیل مری^(۳۲، ۳۳) و

پروستات^(۳۴) با مصرف چای، به‌نظر می‌رسد کاهش در مصرف این فرآورده غذایی به‌عنوان یک راهکار پیشگیری از خطر، خالی از فایده نباشد.

*** سپاس‌گزاری:**

این مقاله، حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۱۲۰۱۶/۲۰/۲۸ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد. بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از مساعدت‌های مسئولین محترم پژوهشی دانشگاه ابراز می‌داریم.

*** مراجع:**

1. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2014; 844: 201-25. doi: 10.1007/978-1-4939-2095-2_10.
2. Pereira RC, Diniz A.dS, Ferreira LOC. New findings on iron absorption conditioning factors. *Brazilian J Mother Child Health* 2004; 4(3): 8-241.
3. Hurrell RF, Reddy M, Cook JD. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr* 1999; 81(4): 289-95. doi: 10. 1017/S0007114599000537.
4. O'Neil-Cutting MA, Crosby WH. The effect of antacids on the absorption of simultaneously ingested iron. *JAMA* 1986; 255(11): 1468-70 doi: 10.1001/jama.255.11. 1468.
5. Franceschi F, Zuccala G, Roccarina D, Gasbarrini A. Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11(4): 234-42. doi: 10.1038/nrgastro.2013.243.
6. Burns M, Muthupalani S, Ge Z, Wang TC, Bakthavatchalu V, Cunningham C, et al. *Helicobacter pylori* infection induces anemia, depletes serum iron storage, and alters local iron-related and adult brain gene expression

- in male INS-GAS mice. PLoS One 2015; 10(11): e0142630. doi: 10.1371/journal.pone.0142630.
7. Noto JM, Gaddy JA, Lee JY, Piazuelo MB, Friedman DB, Colvin DC, et al. Iron deficiency accelerates *Helicobacter pylori* induced carcinogenesis in rodents and humans. J Clin Invest 2013; 123(1): 479-92. doi: 10.1172/JCI64373.
8. Cairo G, Recalcati S. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. Expert Rev Mol Med 2007; 9(33): 1-13. doi: 10.1017/S1462399407000531.
9. Maffettone C, Chen G, Drozdov I, Ouzounis C, Pantopoulos K. Tumorigenic properties of iron regulatory protein 2 (IRP2) mediated by its specific 73-amino acids insert. PLoS One 2010; 5(4): e10163. doi: 10.1371/journal.pone.0010163.
10. Fraser A. Essential human genes. Cell Syst 2015; 1(6): 381-2. doi: 10.1016/j.cels.2015.12.007.
11. Kovacevic Z, Fu D, Richardson DR. The iron-regulated metastasis suppressor, NdrG-1: identification of novel molecular targets. Biochim Biophys Acta 2008; 1783(10): 1981-92. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.016.
12. Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after *H. pylori* eradication in chronic gastritis. Mod Pathol 2006; 19(1): 49-58. doi: 10.1038/modpathol.380047613.
13. Le NT, Richardson DR. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. Blood 2004; 104(9): 2967-75. doi: 10.1182/blood-2004-05-1866.
14. Kyriakou D, Eliopoulos AG, Papadakis A, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Decreased expression of c-myc oncoprotein by peripheral blood mononuclear cells in thalassaemia patients receiving desferrioxamine. Eur J Haematol 1998; 60(1): 21-7. doi: 10.1111/j.1600-0609.1998.tb00992.x.
15. Blanchard TG, Nedrud JG. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. Curr Protoc Microbiol 2006; Chapter 8: Unit8B 1. doi: 10.1002/9780471729259.mc08b01s00.
16. Robriquet F, Lardenois A, Babarit C, Larcher T, Dubreil L, Leroux I, et al. differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation. PLoS One 2015; 10(5): e0123336. doi: 10.1371/journal.pone.0123336.
17. Basu D, Walkiewicz MP, Frieman M, Baric RS, Auble DT, Engel DA. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. J Virol 2009; 83(4): 1881-91. doi: 10.1128/JVI.01805-08.
18. Angstadt AY, Motsinger-Reif A, Thomas R, Kisseberth WC, Guillermo Couto C, Duval DL, et al. Characterization of canine osteosarcoma by array comparative genomic hybridization and RT-qPCR: signatures of genomic imbalance in canine osteosarcoma parallel the human counterpart. Genes Chromosomes Cancer 2011; 50(11): 859-74. doi: 10.1002/gcc.20908.
19. Bruun CS, Jaderlund KH, Berendt M, Jensen KB, Spodsberg EH, Gredal H, et al. A Gly98Val mutation in the N-Myc Downstream regulated gene 1 (NDRG1) in Alaskan Malamutes with polyneuropathy. PLoS One 2013; 8(2): e54547. doi: 10.1371/journal.pone.0054547.

20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
21. Fakhri Y, Amanidaz N, Zandsalimi Y, Dadar M, Moradi A, Moradi B, et al. Association between sodium bicarbonate consumption and human health: a systematic review. *Int J Med Res Health Sci* 2016; 5(8): 22-9.
22. Delimont NM, Haub MD, Lindshield BL. The impact of tannin consumption on iron bioavailability and status: a narrative review. *Curr Dev Nutr* 2017; 1(2): 1-12. doi: 10.3945/cdn.116.000042.
23. Ciacci C, Sabbatini F, Cavallaro R, Castiglione F, Di Bella S, Iovino P, et al. *Helicobacter pylori* impairs iron absorption in infected individuals. *Dig Liver Dis* 2004; 36(7): 455-60. doi: 10.1016/j.dld.2004.02.008.
24. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(5): 1461S-7. doi: 10.3945/ajcn.2010.28674F.
25. Beck KL, Conlon CA, Kruger R, Coad J. Dietary determinants of and possible solutions to iron deficiency for young women living in industrialized countries: a review. *Nutrients* 2014; 6(9): 3747-76. doi: 10.3390/nu6093747.
26. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4(6). pii: a014241. doi: 10.1101/cshperspect.a014241.
27. Montague JA, Butler LM, Wu AH, Genkinger JM, Koh WP, Wong AS, et al. Green and black tea intake in relation to prostate cancer risk among Singapore Chinese. *Cancer Causes Control* 2012; 23(10): 1635-41. doi: 10.1007/s10552-012-0041-8.
28. Konarikova K, Jezovicova M, Kerestes J, Gbelcova H, Durackova Z, Zitnanova I. Anticancer effect of black tea extract in human cancer cell lines. *Springerplus* 2015; 4: 127. doi: 10.1186/s40064-015-0871-4.
29. Su LJ, Arab L. Tea consumption and the reduced risk of colon cancer - results from a national prospective cohort study. *Public Health Nutr* 2002; 5(3): 419-25. doi: 10.1079/PHN2001314
30. Ghaemi A, Mohammadi I, Shoaie Hassani A, Hamdi K, Ordouzadeh N. Inhibitory effect of green and black teas Ethyl acetate extracts on *Helicobacter pylori* the causative agent of peptic ulcers. *J Qazvin Univ Med Sci* 2010; 13(4) :12-8. [In Persian]
31. Miura K, Hughes MC, Arovah NI, van der Pols JC, Green AC. Black tea consumption and risk of skin cancer: an 11-year prospective study. *Nutr Cancer* 2015; 67(7): 1049-55. doi: 10.1080/01635581.2015.1073759.
32. Zamora-Ros R, Lujan-Barroso L, Bueno-de-Mesquita HB, Dik VK, Boeing H, Steffen A, et al. Tea and coffee consumption and risk of esophageal cancer: the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer* 2014; 135(6): 1470-9. doi: 10.1002/ijc.28789.
33. Askari F, Kardoust parizi M, Rashidkhani B. Black tea and coffee intake and prostate cancer: A case-control study. *Scientific J Ilam Univ Med Sci* 2014; 22(6): 60-5. [In Persian]
34. Islami F, Pourshams A, Nasrollahzadeh D, Kamangar F, Fahimi S, Shakeri R, et al. Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study. *BMJ* 2009; 338: b929. doi: 10.1136/bmj.b929.