

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۷ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۴ صفحات ۳۹-۳۵

اثر ویتامین A بر زیست-فراهمی آهن نان لواش در سلولهای Caco-2

بهرام پورقاسم گرگری: دانشجوی PhD علوم تغذیه، گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز؛ نویسنده رابط

E-mail: bahrampg@yahoo.com

دکتر سلطانعلی محبوب: استاد تغذیه و بیوشیمی، گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز
دکتر سید ولی رضویه: استاد یار تغذیه، گروه تغذیه جامعه، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز
دکتر بهروز نیک نفس: استادیار آناتومی، دانشکده پزشکی و آزمایشگاه بافت و بیولوژی سلولی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز
حسین کوشاور: مربی گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز

دریافت: ۸۳/۳/۱۹، بازنگری نهایی: ۸۳/۷/۲۵، پذیرش: ۸۳/۸/۶

چکیده

زمینه و اهداف: فقر آهن و کمبود دریافت ویتامین A شایعترین مشکلات تغذیه‌ای در دنیا و کشور ما محسوب می‌شوند. تداخل ویتامین A با آهن به اثبات رسیده است، ولی مکانیسم دقیق این تداخل مشخص نیست. یکی از محل‌های احتمالی تداخل ویتامین A با آهن می‌تواند در مرحله جذب آن باشد. با عنایت به این موضوع و با توجه به اینکه در کشور ما تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی زیست-فراهمی عناصر از جمله آهن انجام نگرفته است، لذا مطالعه حاضر به منظور تعیین میزان زیست-فراهمی آهن نان لواش و اثر ویتامین A بر آن انجام گرفت.

روش بررسی: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی، تجربی با استفاده از سلولهای Caco-2 و با هضم نمونه نان تحت شرایط مشابه دستگاه گوارش-هضم معدی و هضم روده‌ای-انجام گرفت. سلولها تحت شرایط استاندارد در روی غشاهای کلاژن‌دار ما بین دو اتاقک حفره‌های پلیت‌های ۶ حفره‌ای کشت شدند. بعد از یکپارچگی کامل سلولی، درصد جذب آهن نمونه نان هضم شده با ویتامین A-۱۰۰۰ میکروگرم درصد گرم و نمونه نان بدون ویتامین A با استفاده از کلرید آهن (III) نشان‌دار اندازه‌گیری شد. زیست-فراهمی آهن بصورت درصدی از آهن نشان‌دار اولیه که توسط سلولها برداشت شده و به محیط تحتانی انتقال یافته اند، تعریف شد.

یافته‌ها: میانگین و انحراف معیار درصد جذب آهن در نمونه نان فاقد ویتامین A (n=۲۳) و نمونه نان حاوی ویتامین A (n=۲۲) به ترتیب: 76.2 ± 3.2 و 73.1 ± 1.7 درصد بود ($p < 0.001$). با ۹۵ درصد اطمینان حدود درصد جذب آهن نان بدون ویتامین A، $1.99-3.47$ و با ویتامین A، $5.2-7.04$ درصد بود. ویتامین A بصورت معنی‌دار باعث افزایش جذب آهن غیر Hem در نان تا حد $2/4$ برابر می‌شد.

نتیجه‌گیری: زیست-فراهمی آهن موجود در نان لواش در سلولهای Caco-2 پایین است ولی با افزایش ویتامین A زیاد می‌شود. تشابه نتایج مدل Caco-2 با یافته‌های مطالعات انجام گرفته در شرایط بدن حاکی از آن است که این سلولها مدلی مناسب جهت مطالعات مختلف تغذیه‌ای می‌تواند باشد.

کلیدواژه‌ها: زیست-فراهمی آهن، نان، ویتامین A، سلولهای Caco-2.

مقدمه

حدود صد سال است که تداخل ویتامین A با آهن و ارتباط آن با فقر آهن و کم خونی فقر آهن نشان داده شده است (۷). در مطالعات مختلفی مکمل ویتامین A به تنهایی یا همراه با آهن باعث بهبود فقر آهن و کم خونی شده است (۸-۱۰). مکانیسم‌های متعددی برای توضیح این تداخل اثر مطرح شده است. یکی از این مکانیسم‌ها تداخل ویتامین A با آهن در مرحله جذب آن است. در بعضی از مطالعات ویتامین A باعث افزایش جذب آهن و زیست-فراهمی آن شده است (۱۱-۱۴). در حالیکه در مطالعات دیگری اثری از ویتامین A بر جذب آهن مشاهده نشده است (۱۵-۱۷).

سلولهای Caco-2 از مخاط کولون مشتق شده و بعد از رشد و تمایز خصوصیات مشابه با سلولهای مخاط روده را پیدا می‌کنند (۱۸-۲۱). از آنجا که مطالعات انسانی جهت بررسی زیست-فراهمی

شایعترین مشکل تغذیه‌ای در دنیا فقر آهن است. حدود ۲ میلیارد انسان به نوعی از عوارض سوء فقر آهن رنج می‌برند. عواملی چون کمبود دریافت آهن، افزایش نیاز به آهن- به علت مسایل بالینی و فیزیولوژیک- منجر به فقر آهن می‌شوند (۱-۲). مطالعات در جوامع مختلف و کشور ما حاکی از آن است که دریافت آهن بیشتر از حد نیاز است، ولی با اینحال فقر آهن هنوز مشکل اصلی تغذیه‌ای محسوب می‌شود (۳-۵). یکی از دلایل احتمالی این مساله زیست-فراهمی کم آهن دریافتی است (۳). در کشور ما تاکنون مطالعه‌ای در جهت بررسی زیست-فراهمی عناصر از جمله آهن انجام نگرفته است. کمبود دریافت ویتامین A یکی دیگر از مشکلات شایع تغذیه‌ای در دنیا و کشور ما محسوب می‌شود (۳، ۶).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مقدار پروتئین سلولی، شمارش آهن نشان‌دار- در دقیقه- در محیط فوقانی، سلولها، محیط تحتانی و کل شمارش هر حفره در دو گروه نان حاوی ویتامین A و نان بدون ویتامین A.

شاخص گروهها	پروتئین سلولی (میلی گرم)	شمارش در محیط فوقانی سلول	شمارش در سلولها	شمارش در محیط تحتانی سلول	جمع آهن نشان دار در هر حفره
نان حاوی ویتامین A (n=۲۲)	۱/۳۵ ± ۰/۱۸	۱۱۱۰/۵۵ ± ۱۶۲/۷۸	۶۱/۵۵ ± ۳۲/۹۴	۱۹/۳۶ ± ۱۸/۸۳	۱۱۹۱/۴۵ ± ۱۸۲/۸۷
نان بدون ویتامین A (n=۲۳)	۱/۲۵ ± ۰/۱۷	۱۱۵۷/۷۴ ± ۲۴۱/۴۷	۲۶/۶۱ ± ۲۰/۰۰	۵/۹۱ ± ۴/۱۱	۱۱۹۰/۲۶ ± ۲۴۸/۷۷
تی تست	NS*	NS	p<۰/۰۰	p<۰/۰۰	NS

* غیر معنی دار

بحث

مطالعه از نوع In vitro با استفاده از سلولهای Caco-2 جهت بررسی زیست-فراهمی آهن نان لواش و اثر ویتامین A بر آن بود. سلولهای Caco-2 از مخاط کولون مشتق شده‌اند این سلولها منشأ آنوکارسینومایی دارند (۱۸). بعد از رشد و تمایز خصوصیات مشابه با سلولهای مخاط روده از قبیل داشتن میکروویز، ترشح آنزیمهای مخاطی، اتصالات بین سلولی از نوع اتصالات محکم و بسیاری خصوصیات مشابه دیگر را پیدا می‌کنند (۲۱-۱۹). از آنجا که مطالعات انسانی جهت بررسی زیست-فراهمی عناصر از جمله آهن احتیاج به آهن نشان‌دار دارد و نتایج مطالعات حیوانی چون قابل تعمیم به انسان نیست، لذا استفاده از این مدل در جهت بررسی زیست-فراهمی عناصر مختلف از جمله آهن توصیه شده است. این سلولها در مطالعات مربوط به بررسی زیست-فراهمی آهن و نقش عوامل مختلف بر آن مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۶-۲۲).

عامل مهم که در استفاده از این سلولها باید مورد توجه قرار گیرد رسیدن این سلولها به یکپارچگی کامل بعد از کشت است. روشهای مختلفی جهت بررسی یکپارچگی کامل این سلولها وجود دارد، از جمله آنها می‌توان به آزمون "نشت فنول رد" اشاره کرد. در مطالعات مختلف از این شاخص جهت بررسی یکپارچگی سلولی استفاده شده است (۲۶، ۲۵، ۲۳، ۱۵). مقادیر کمتر از ۰.۲٪ در محیط تحتانی نشانگر یکپارچگی سلولی است (۲۵). ارقام بدست آمده مطالعه ما حاکی از یکپارچگی کامل سلولی است.

اصل مهم دیگر در مطالعات بررسی زیست-فراهمی آهن هموژن کردن کامل نمونه با آهن نشان دار است. در حقیقت استفاده از آهن نشان دار در بررسی جذب آهن مواد غذایی بر این اصل استوار است که تمام آهن غیر هم مواد غذایی جهت جذب وارد فضای میشود که به اصطلاح به آن حوض آهن^۲ گفته میشود و چون آهن تنها عنصری است که میزان جذب آن تقریباً با میزان زیست-فراهمی آن برابر است (۲۸)، لذا در اکثر مطالعات از "زیست-فراهمی آهن" عوض "جذب آهن" استفاده میشود. آهن غیر هم در مواد غذایی عمدتاً از نوع فریک است (۲۹) لذا در مطالعه از Fe³⁺ نشان دار استفاده شد.

مطالعه ما نشان داد که متوسط درصد جذب آهن نان لواش ۲/۳٪ (با حدود اطمینان ۹۵ درصد: ۱/۹۹-۳/۴۷) است. درصد جذب آهن غیرهم مواد غذایی کمتر از یک درصد تا صددرصد برآورده شده است (۲۸). نتایج مطالعات مربوط به میزان جذب آهن نان بسیار متفاوت است. Widdowson و همکارانش (۳۰) با روش تعادل

دینامیکی جذب آهن نان سفید را در افراد مختلف ۱۴/۰-۲/۳ درصد نشان دادند. Hussain و همکاران (۳۱) با استفاده از آهن نشان دار ۴/۵٪ (۷/۴-۱/۱) جذب آهن نان سفید را گزارش کرده اند در مطالعه دیگری توسط Callender و همکاران (۳۲) نتایجی شبیه یافته‌های ما بدست آمد. محققین فوق در مطالعه بر روی افراد سالم و مبتلا به فقر آهن نشان دادند که در افراد سالم ۵/۴-۰ درصد (میانگین ۲/۶٪) و در افراد مبتلا به فقر آهن ۱۸/۳-۰ (میانگین ۰.۷٪) آهن از نان سفید جذب می‌شود. در مطالعه دیگری (۳۳) آهن از نان حاوی ۱۰٪ سوس به میزان ۱/۲۶٪ جذب شده است. Brune و همکارانش (۳۴) با استفاده از آهن نشان‌دار جذب آهن نان تهیه شده از آرد ۵۵٪ و ۸۵٪ را به ترتیب ۲۲٪ و ۸۹٪ نشان دادند. درصد جذب آهن نان با توجه به حضور عوامل مداخله گر در جذب آهن چون اسید فیتیک، پولی فنولها، ویتامین C، برخی اسید آمینه ها و ...، شرایط دستگاه گوارش و نیاز بدن متغیر است (۲۸، ۲۹). نتایج مطالعه ما در حد نتایج مطالعات انسانی است.

نتایج مطالعه ما حاکی از اثر معنی دار ویتامین A به صورت رتینیل استات - ۱۰۰۰ میکروگرم به ازای صدگرم - در افزایش جذب آهن بود. Garcia - Casal و همکاران (۱۵) در مطالعه‌ای روی سلولهای Caco-2 اثری از ویتامین A - بصورت رتینول پالمیتات - را در جذب آهن مشاهده نکردند. در این مطالعه بدون حضور عوامل مداخله گر در جذب آهن چون اسید فیتیک و اسید تانیک اثر ویتامین A بر جذب آهن بررسی شده و آهن مورد استفاده از نوع آهن فرو - بصورت فروس فومارات - است. در این مطالعه B- کاروتن حتی با حضور عوامل مداخله گر در جذب آهن باعث افزایش جذب آهن شده است. ساجدیان فرد و همکاران (۱۶) در مطالعه بر روی رتهای کم خون اثری از ویتامین A در جذب آهن مشاهده نکردند. در این مطالعه تفاوتی در درمان کم خونی با مصرف سولفات فرو و ویتامین A از راههای مختلف چون تزریقی و دهانی وجود نداشت، لذا محققین مطالعه بیان داشتند که احتمالاً ویتامین A اثری در جذب آهن ندارد. عدم وجود تفاوت در نتیجه مداخلات جهت درمان کم خونی بیانگر اثر ویتامین A در افزایش جذب آهن از دستگاه گوارش می‌تواند باشد، زیرا که در حالت عادی جذب سولفات فرو از دستگاه گوارش کمتر از مقدار تزریقی است.

Mejia و همکارانش (۱۷) در رت مبتلا به کمبود ویتامین A اثری از مکمل ویتامین A بر جذب آهن را نشان ندادند. در مطالعات

جدید بودن نظریه نقش ویتامین A در جذب آهن موضوع احتیاج به مطالعات بیشتر دارد.

مطالعه ما از لحاظ بررسی درصد جذب آهن نان و کشت سلولهای Caco-2 در پلیتهای دو حفره‌ای بر روی غشاء کلاژن‌دار و ایجاد محیط مشابه غشای مخاطی روده برای اولین بار در کشور حایز اهمیت است. با ایجاد این مدل امکان انجام مطالعات تغذیه‌ای و حتی دارویی فراهم می‌شود.

نتیجه‌گیری

آهن موجود در نان لواش زیست-فراهمی پایینی دارد. عواملی چون ویتامین A می‌تواند باعث افزایش درصد جذب آهن نان در مدل *In vitro* با استفاده از سلولهای Caco-2 شود. از آنجا که امروز برنامه غنی‌سازی مواد غذایی با آهن در مرحله اجرا است، لزوم بازنگری در این برنامه‌ها جهت بررسی امکان غنی‌سازی همزمان آهن و ویتامین A احساس می‌شود، حتی امکان افزایش زیست-فراهمی آهن مواد غذایی تنها با اضافه کردن ویتامین A بایستی ارزیابی شود.

تقدیر و تشکر

انجام دهندگان این تحقیق مراتب تقدیر و سپاس خود را از امنیت غذا و تغذیه استان آذربایجان شرقی که حمایت مالی طرح را برعهده داشت و آزما یسگاه بافت و بیولوژی سلولی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که بدون همکاریهای ارزنده‌شان انجام این طرح مقدور نبود، ابراز می‌دارند.

References

- Mahan LK, Escott – Stump S. Krause's Food, Nutrition, & Diet Therapy. 10 th edition. *W B Saunders Company*, 2000; PP: 70-74,125-131, 782-788.
- Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML. *Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia*. INACG, Washington DC, ILSI press, 2002; PP: 1-2.
- قاسمی ح. امنیت غذا و تغذیه کشور، مطالعات الگوی برنامه‌ریزی و اجرا "مابا"، گزارش نهایی طرح. انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، سازمان برنامه و بودجه، تهران، دی‌ماه ۱۳۷۷، صفحات: ۲۹، ۵۴، ۹۷، ۹۸، ۱۱۸، ۱۵۱.
- Pourghassem GB, Kimiagar SM, Abolfathi AA, Vallaii N, Gafarour M. Prevalence of iron deficiency, anemia and iron deficiency anemia in high school students in Jolfa, East Azarbaijan. *Food & Nut Bullet* 2000; **21**(3): 301-304.
- رسایی ب، کشاورز ع، جزایری ا، غفارپور م. بررسی کیفیت رژیم غذایی بر اساس چگالی ماده مغذی در هفت استان کشور، خلاصه مقالات پنجمین کنگره تغذیه ایران: امنیت غذا و تغذیه خانوار،

مختلف مدل حیوانی به عنوان مدلی مناسب جهت بررسی عوامل موثر در جذب آهن و تعمیم آنها به انسان گزارش نشده است (۳۵). بر خلاف مطالعات فوق در مطالعات دیگر نتایج شبیه به مطالعه ما بدست آمده است. Layrisse و همکارانش (۱۱) در مطالعه بر روی انسان اثر بارز ویتامین A را در افزایش جذب آهن نان نشان دادند. در این مطالعه زیست-فراهمی آهن نان غنی شده با ویتامین A بیشتر از نان غنی نشده، حتی در حالتی که با قهوه مصرف می‌شد، بوده است.

Garscia – Casal و همکاران (۱۲) اثر معنی‌دار ویتامین A را در افزایش جذب آهن در انسان نشان دادند. در مطالعه آنها ویتامین A باعث افزایش جذب آهن برنج، گندم و ذرت به ترتیب ۲/۰، ۰/۸ و ۱/۴ برابر می‌شد. اثر B- کاروتن حتی بیشتر بود. مقدار افزایش جذب در اثر B- کاروتن برای سه نمونه فوق به ترتیب ۳/۰، ۱/۸ و ۱/۸ برابر بود. Layrisse و همکاران (۱۳) در مطالعه دیگری نشان دادند که ویتامین A می‌تواند باعث کاهش اثرات ممانعتی فیتات و پولی فنولها در جذب آهن شود. افزایش جذب آهن غنی شده در اثر ویتامین A در مطالعه دیگری در روی انسان نشان داده شده است (۱۴).

با توجه به نتایج مطالعه ما و مطالعات فوق به نظر می‌رسد که ویتامین A اثرات ممانعتی فیتات را در جذب آهن کاهش می‌دهد. Gascia – Casal و همکاران (۱۴و۱۲) و Layrisse و همکاران (۱۱و۱۳) بیان داشته اند که احتمالاً ویتامین A در طی هضم با آهن کمپلکس تشکیل داده و در نتیجه از تشکیل کمپلکس فیتات یا سایر عوامل کاهنده با آهن جلوگیری می‌کند. مکانیسم دوم می‌تواند تشکیل کمپلکس ویتامین A با خود فیتات و پولی فنولها باشد. با توجه به

انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، چاپ اول، تهران ۱۳۷۸، صفحه: ۵۱.

- Reddy V. Vitamin A and iron interactions .International vitamin A consultative group (IVACG) statement. USA, 1998.
- Koessler K, Mauer S, Loughlin R. The relation of anemia primary and secondary to vitamin A deficiency. *J Am Med Assoc* 1926; **87**: 476-82.
- Mejia LA, Chew F. Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. *Am J Clin Nutr* 1988; **48**(3): 595-600.
- Mwanri L, Worsley A, Ryan P, Masika J. Supplemental vitamin A improve anemia and growth in anemic school children in Tanzania. *J Nutr* 2000; **130**: 2691-2696.
- Ahmed F, Rahman khan M, Jackson AA. Concomitant supplemental vitamin A enhances the response to weekly supplemental iron and folic acid in anemic teenagers in urban Bangladesh. *Am J Clin Nutr* 2001; **74**:108-115.
- Layrisse M, Garcia-Casal MN, Solano L, Baron MA, Arguello F, Llovera, D, et al. The role of

- vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results. *J Nutr Biochem* 1997; **8**: 61-67.
12. Garcia- Casal MN, Layrisse M, Solano L, Baron MA, Arguello F, Llovera D, et al. vitamin A and B –carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J Nutr*. 1998; **128**(3): 646-650
 13. Layrisse M, Garcia- Casal MN, Solano L, Baro MA, Arguello F, Llovera D, et al. Vitamin A reduces the inhibition of iron absorption by phytates and polyphenols. *Food & Nutrition Bulletin* 1998; **19**(1): 3-5.
 14. Garcia- Casal MN, Layrisse M, Pena- Rosas JP, Ramirez J, Leets I, Matus P. Iron absorption from elemental iron – fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C. *Nutrition Research* 2003; **23**: 451-463.
 15. Garcia- Casal MN, Leets I, Layrisse M. B-Carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr* 2000; **130**(1): 5-9.
 16. Sajedianfard J, Boroujeni HM, Habibzadeh F. Therapeutic values of different routes of administration of vitamin A with ferrous sulfate in treating deferoxamin- induced iron deficiency anemia. *J Nutr Sci Vitaminol* 1999; **45**(1): 31-7.
 17. Mejia LA, Hodges RE, Rucker RB. Role of vitamin A in the absorption, retention and distribution of iron in the rat. *J Nutr* 1979; **109**: 129-137.
 18. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of Hela cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl cancer Inst* 1997; **58**(2): 209-214.
 19. Pinto M, Robine – Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, et al. Enterocyte- like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol cell* 1983; **47**: 323-330.
 20. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borhardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; **96**: 736-749.
 21. Delie F, Rubas W.A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1997; **14**(3): 221-286.
 22. Alvarez–Hernandez X, Nichols GM, Glass J. Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; **1070**: 205-208.
 23. Garcia MN, Flowers C, Cook JD. The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. *J Nutr* 1996; **126**: 251-58.
 24. Glahn RP, Wien EM, Van Campen DR, Miller DD. Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *J Nutr* 1996; **126**: 332-339.
 25. Ismil M. The use of Caco-2 cells as an in vitro method to study bioavailability of iron. *Mal J Nutr* 1999; **5**: 31-45.
 26. Au AP, Reddy MB. Caco-2 cells can be used to assess human iron bioavailability from a semi purified meal. *J Nutr* 2000; **130**: 1329-1334.
 27. Glahn RP, Gangloff MB, Van Campen DR, Miller DD, Wien EM, Norvell WA. Removal of surface-bound iron from Caco-2 cell monolayers. *The FASEB J*, 1995; **9**(4): A 984.
 28. Hurrell RF. Bioavailability of iron. *Eur J Clin Nutr* 1999; **51**(supl 1): S4-S8.
 29. Benito P, Miller D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition research* 1998; **18** (3): 581-603.
 30. Widdowson EM, Mc Cance RA. Iron exchanges of adults on white and brown bread diets. *The Lancet* 1942; **16**: 588-590.
 31. Hussain R, Walker RB, Layrisse M, Clark P, Finch CA. Nutritive value of food iron. *Am J Clin Nutr* 1965; **16**: 464-471.
 32. Callender ST, Warner GT. Iron absorption from bread. *Haematologia* 1971; **5**(4): 369- 375.
 33. Bjorn – Rasmussen E. Iron absorption from wheat bread influence of various amounts of bran. *Nutr Metab* 1974; **16**: 101-110.
 34. Brune M, Rossander-Hulten L, Halberg L, Gleeurup A, Sandberg AS. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J Nutr* 1992; **122**: 442-449.
 35. Reddy MB, Cook JD: Assessment of dietary determinants of nonheme – iron absorption in humans and rats. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 723 – 728.