

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۵ صفحات ۳۷-۳۱

اثر ویتامین های E, C و β -کاروتن بر آسیب DNA ناشی از آهن در سلولهای Caco-2

دکتر بهرام پورقاسم گرگری: استاد یار گروه تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط

E-mail: bahrampg@yahoo.com

مهدیه حامد بهزاد: کارشناس تغذیه
عبدالرسول صفائیان: مربی گروه اپیدمیولوژی و آمار دانشگاه علوم پزشکی تبریز
پروفیسور دینا آندرسون: استاد دانشگاه برادفورد انگلیس

دریافت: ۸۴/۵/۲۳، پذیرش: ۸۴/۸/۲۵

چکیده

زمینه و اهداف: نقش آهن و ویتامین های آنتی اکسیدان بر روی DNA بخوبی شناخته شده نیست، لذا مطالعه اخیر جهت تعیین نقش آهن (Fe^{+3}) به تنهایی و یا همراه با نیتریلوتری استیک اسید (Nitritoltriactic Acid, NTA) در آسیب رسانی به DNA و اثر ویتامین های E, C و β -کاروتن بر آسیب DNA ناشی از آهن انجام گرفت.

روش بررسی: سلولهای Caco-2 مدل سلولهای مخاط روده، با مقادیر مختلف آهن Fe^{+3} (۵۶۰-۰ میکرومول در لیتر) به تنهایی یا همراه با NTA برای ۰/۵ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس با استفاده از روش Comet میزان آسیب DNA اندازه گیری شد. برای مرحله دوم مطالعه سلولها با یک مقدار ثابت از آهن (۱۶۰ میکرومول در لیتر) و NTA همراه با مقادیر مختلف از ویتامین های C (۳۲۰-۰ میکرومول در لیتر)، E (۳۲۰-۰ میکرومول در لیتر) و β -کاروتن (۱۲-۰ میکرومول در لیتر) در انکوباتور قرار داده شده و میزان آسیب DNA دوباره اندازه گیری شد.

یافته ها: مطالعه نشان داد آهن (به صورت Fe^{+3}) به تنهایی اثری در آسیب رسانی به DNA ندارد ولی همراه با NTA در مقادیر بیش از ۱۶۰ میکرومول باعث آسیب معنی دار در DNA می شود. ویتامین های C و E در دوزهای کم (به ترتیب: ۲/۵ و ۲/۵-۱۰ میکرومول در لیتر) باعث کاهش آسیب DNA ناشی از آهن می شدند. β -کاروتن اثری در کاهش آسیب DNA ناشی از آهن نداشت. هر سه ویتامین در غلظت های بالاتر باعث افزایش آسیب DNA می شدند ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: در مدل سلولهای Caco-2، آهن محلول از یک غلظت بالاتر باعث ایجاد آسیب در DNA می شود. وجود مقادیر زیاد ویتامین های آنتی اکسیدان همراه آهن، باعث تشدید اثر آهن در تخریب DNA می شود.

کلیدواژه ها: آزمون Comet، آسیب DNA، آهن، ویتامین های E, C و β -کاروتن

مقدمه

عوامل شلالته کننده چون اسید نیتریلوتری استیک نتایج متناقضی به دست آمده است (۱۱-۳).

از طرف دیگر ویتامین های E, C و β -کاروتن جزو عواملی هستند که دریافت آنها همراه با کاهش آسیب DNA و در نتیجه کاهش خطر سرطان است (۱۵-۱۲). با اینحال در مطالعات دیگر نقش متضاد از این ویتامین ها - به عنوان عوامل پروکسیدان - هم مطرح شده است (۲۱-۱۶). مکملهای غذایی (مواد معدنی، ویتامینی) وارد دستگاه گوارش می شوند، در دستگاه گوارش نقش و تداخل آنها در آسیب رسانی به DNA سلولهای مخاطی به خوبی مشخص نشده است. با توجه به مطالب فوق در این مطالعه

مطالعات مختلفی حاکی از آن است که آسیب DNA باعث افزایش احتمال بروز بیماریهایی چون سرطان می شود (۱). آسیب DNA در اثر عوامل مختلفی چون: اشعه X، اشعه UV، H_2O_2 و ... ایجاد می شود (۲). از عوامل دیگری که می توانند باعث صدمه و آسیب DNA شوند می توان به عوامل تغذیه ای اشاره کرد. آهن عنصری ضروری جهت حیات است، با اینحال در مطالعات چندی اثر آهن در القای آسیب به DNA و در نتیجه بروز سرطان نشان داده شده است، در حالیکه در مطالعات دیگری این موضوع رد شده است (۱۱-۳). با توجه به نوع آهن (Fe^{2+} , Fe^{3+})، نمک مورد استفاده از آن (سولفات، کلراید) و استفاده یا عدم استفاده از

بعد از انکوباسیون و تریپتسیاسیون سلولها، نمونه‌ها با دور ۱۵۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و محلولهای رویی دور ریخته شد. از نمونه‌های سلولی جهت انجام آزمون Comet استفاده شد.

- آزمون Comet. تهیه اسلایدها، لیزسلولی، الکتروفورز، خشتی‌سازی و رنگ‌آمیزی اسلایدها به صورت کامل بر اساس روش‌های توصیف شده و استاندارد انجام گرفت (۶، ۷ و ۱۶). بصورت خلاصه: حدود ۱۰۰۰۰ سلول زنده با آگار با درجه ذوب پایین مخلوط و به صورت یک لایه روی اسلاید حاوی آگار با درجه ذوب بالا ریخته شد. لایه سوم آگار اضافه شد. اسلاید تهیه شده با محلول لیزکننده حاوی تریتون و دی متیل سولفواکسید لیز شد، سپس الکتروفورز برای ۲۰ دقیقه در ۲۶ ولت و ۳۰۰ میلی آمپر انجام گرفت. عمل خشتی‌سازی با بافر تریس انجام شد، سپس عمل رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت، و سر آخر نتایج بررسی گردیدند.

- بررسی نتایج آزمون Comet. نتایج آزمایشات با استفاده از برنامه کامپیوتری Comet 5 قرائت شدند. شاخص مورد استفاده حرکت دم (Tail Moment) بود که برابر است با چگالی DNA ضربدر مسافت طی شده آن. این شاخص به عنوان حساسترین شاخصهای آزمون Comet تعریف شده است (۲۴). آزمایشات چهار مرتبه تکرار شدند.

از آنجایی که روشهای مختلفی جهت تحلیل نتایج حاصله از آزمون Comet وجود دارد و بهترین راه ارایه نتایج استفاده از صدکهاست (۲۸)، لذا نتایج به صورت نمودارهای Box-Whisker که شامل: میانه، دامنه (حداکثر و حداقل) و صدکهای ۲۵ و ۷۵ است، ارائه شدند. با توجه به عدم توزیع نرمال نتایج و تکرار آزمایش (۴ n=) برای هر مقدار، آزمونهای آماری یکطرفه ANOVA و من وشی جهت بررسی اثر ویتامین های E، C، ویتامین E و β -کاروتن بر آسیب DNA ناشی از آهن (Fe³⁺/NTA) انجام گرفت. آزمونهای آماری با استفاده از برنامه SPSS 11 انجام گرفت. نتایج در سطح $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

درصد سلولهای زنده بیش از ۹۰ درصد بود. اتانول و استون در غلظت‌های مورد استفاده جهت تهیه غلظت‌های اولیه از ویتامینهای E و β -کاروتن اثری بر DNA نداشتند. آهن به تنهایی به صورت FeCl₃ در دوزهای ۶۲۰-۰ میکرومول در لیتر و NTA به تنهایی در غلظت‌های ۱۲۴۰-۰ میکرومول در لیتر اثر معنی‌داری در ایجاد صدمه و آسیب بر روی DNA نداشتند.

نتایج اثر آهن به شکل Fe³⁺ همراه NTA(Fe³⁺/NTA) در نمودار ۱ آورده شده است. آهن در مقادیر بیش از ۱۶۰ میکرومول در لیتر اثر معنی‌داری در ایجاد آسیب DNA در سلولهای Caco-2 داشت، لذا برای قسمت دوم مطالعه از این مقدار استفاده شد.

نتایج اثر ویتامین‌های E، C، و β -کاروتن بر آسیب DNA ناشی از ۱۶۰ میکرومول در لیتر آهن به شکل Fe³⁺/NTA، در

تصمیم گرفته شد: اولاً: اثر آهن به تنهایی و همراه با NTA در مقادیر مختلف بر DNA ارزیابی شود. ثانیاً: اثر ویتامین‌های E، C و β -کاروتن بر آسیب DNA ناشی از آهن بررسی گردد.

در مطالعه از روش Comet جهت بررسی آسیب DNA در سلول‌های Caco-2 استفاده شد. این سلولها منشأ کارسینومایی داشته و از مخاط کولون مشتق شده‌اند (۲۲). این سلولها بعد از رشد و تکثیر بسیاری از خصوصیات سلولهای مخاط روده را از خود نشان می‌دهند، لذا به عنوان مدل مخاطی روده تعریف شده‌اند (۲۳). روش Comet به عنوان مدل مخاطی روده تعریف شده‌اند جهت بررسی آسیب و صدمه DNA مطرح شده است (۲۴ و ۲۵).

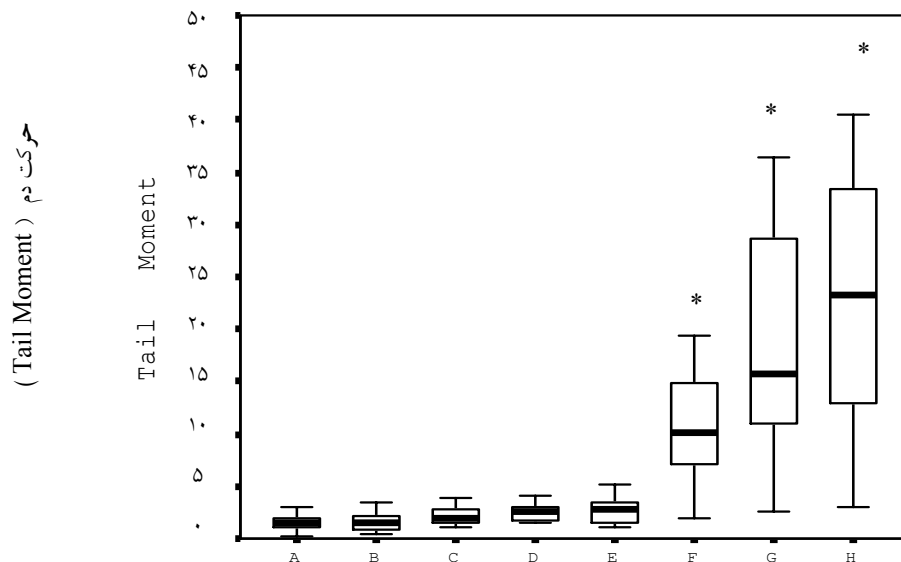
مواد و روش‌ها

- آماده‌سازی سلولهای Caco-2. سلولها در محیط کشت MEME حاوی ۱۰٪ سرم گوساله گاوی، ۱٪ محلول آنتی‌بیوتیک، ۱٪ محلول آمینواسیدهای غیر ضروری و ۱٪ L-گلوتامین در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت شدند. عمل انکوباسیون در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ جریان هوای معمولی انجام گرفت. محیط کشت هر دو روز یکبار عوض شد. سلولها بعد از رسیدن به ۱۰۰٪ - ۸۰ یکپارچگی (۶-۵ روز بعد از کشت) با استفاده از محلول بافری فسفات (PBS) ۲، حاوی ۵۸ میلی‌مول در لیتر Na₂HPO₄، ۱۷ میلی‌مول در لیتر NaH₂PO₄، و ۶۸ میلی‌مول در لیتر NaCl با pH=۷/۴ شستشو شدند. سپس سلولها با محیط کشت حاوی آهن (۵۶۰-۰ میکرومول در لیتر) به تنهایی - به صورت کلرید آهن III - و یا همراه با NTA (آهن)/NTA: نسبت مولی ۱ به ۲) برای ۰/۵ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. محلول آهن-NTA با مخلوط کردن کلرید آهن III در HCl یک نرمال و نیتروتری استیک اسید در آب مقطر تهیه شد.

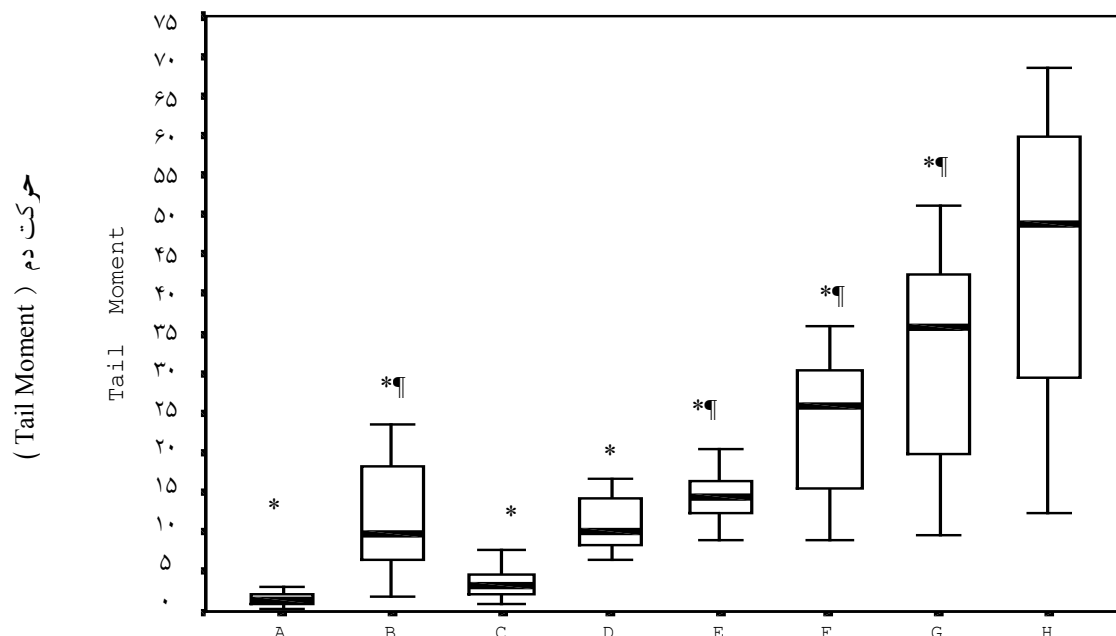
Lund و همکارانش (۲۵) نشان داده‌اند که آهن مکمل مقدار آهن آزاد در مدفوع را تا ۳۰۰ میلی‌مول افزایش می‌دهد، لذا در این مطالعه از مقادیر بالا استفاده شد. بعد از انکوباسیون، سلولها با محلول بافری فسفات شسته شدند. سپس با محلول تریپسین - EDTA از فلاسک جدا شده و درصد سلولهای زنده با تریپان بلو بررسی شد. در قسمت دوم مطالعه، سلولها با محیط کشت حاوی مقادیر مختلف ویتامین C (۳۲۰-۰ میکرومول در لیتر)، ویتامین E (۳۲۰-۰ میکرومول در لیتر)، و یا β -کاروتن (۱۲-۰ میکرومول در لیتر) به همراه یک مقدار ثابت آهن (۱۶۰ میکرومول در لیتر) برای نیم ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. مقادیر پلاسمایی ویتامین های E، ویتامین C، و β -کاروتن به ترتیب: ۲۰-۹۰، ۳۵-۱۹، ۱۰-۲۵ میکرومول در لیتر هستند (۱۹، ۲۶ و ۲۷)، لذا مقادیر مورد استفاده در مطالعه ما در حدود مقادیر فیزیولوژیک بود. غلظت‌های اولیه از ویتامین های E، C، و β -کاروتن به ترتیب در آب، اتانول و استون تهیه شدند. غلظت‌های نهایی با استفاده از محیط کشت تهیه شد. حداکثر غلظت مورد استفاده از حلال کمتر از ۰/۵٪ بود. برای حلالهای استون، اتانول و NTA آزمونهای کنترل انجام گرفت.

DNA ناشی از آهن را نشان می داد. β - کاروتن تا حد ۳ میکرومول در لیتر هیچگونه اثری در کاهش و یا افزایش آسیب DNA ناشی از آهن نداشت. در بقیه مقادیر مورد استفاده هر سه ویتامین باعث افزایش معنی دار آسیب DNA ناشی از آهن می شدند ($p < 0.05$).

نمونه‌های ۴-۲ آورده شده است. ویتامین C در دوز ۲/۵ میکرومول در لیتر باعث کاهش معنی دار در آسیب DNA ناشی از آهن می شد، در حالیکه در بقیه دوزهای مورد استفاده باعث تشدید آسیب ناشی از آهن می گردید ($p < 0.05$). ویتامین E در مقادیر بیشتری (۱۰-۲/۵) نسبت به ویتامین C اثر کاهندگی آسیب

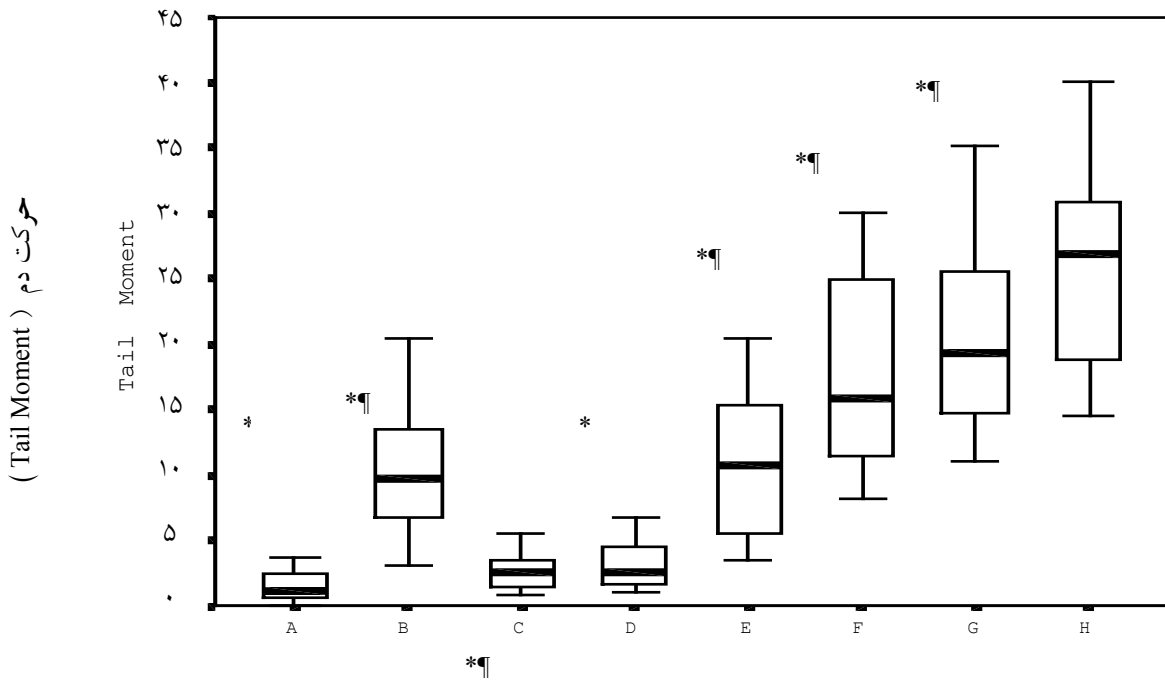


نمودار ۱: دامنه (حداکثر و حداقل)، صدکهای ۲۵، ۷۵ و میانه اثر آهن بصورت Fe^{3+}/NTA بر آسیب رسانی به DNA در سلولهای Caco-2. (A): سلولهای کنترل؛ (B-H): کنترل + آهن در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰ و ۶۴۰ میکرومول در لیتر. * اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل ($p < 0.05$).

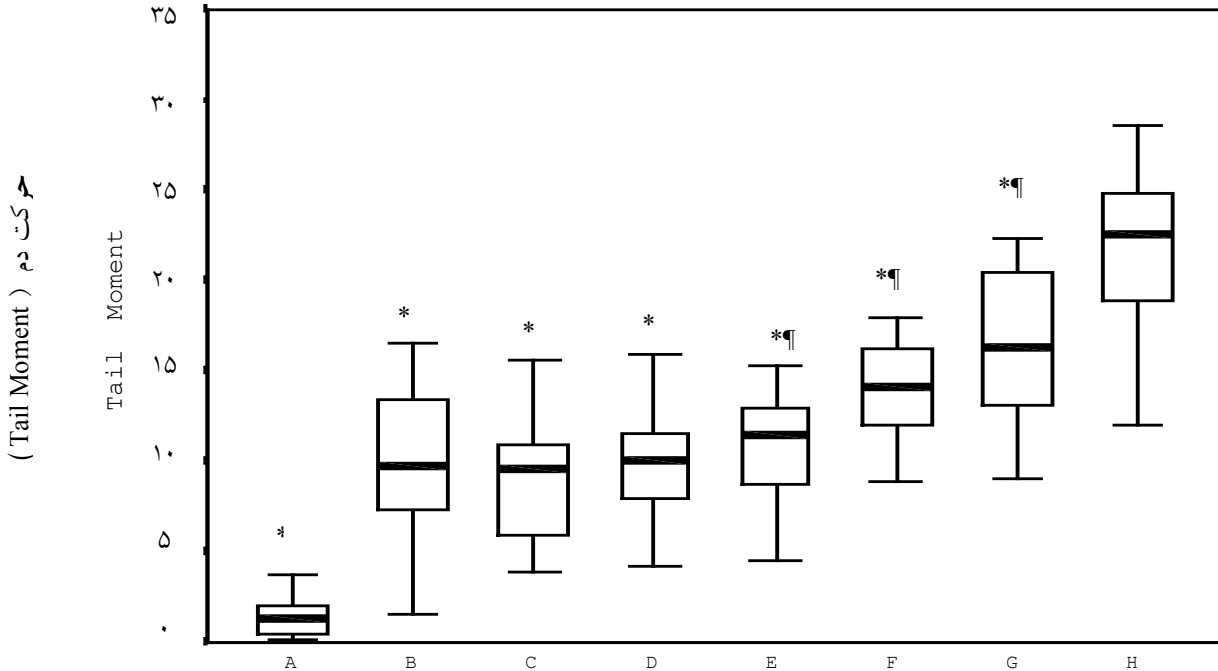


نمودار ۲: دامنه (حداکثر و حداقل)، صدکهای ۲۵، ۷۵ و میانه اثر غلظت های مختلف ویتامین C بر آسیب DNA ناشی از ۱۶۰ میکرومول در لیتر آهن بصورت Fe^{3+}/NTA در سلولهای Caco-2. (A): سلولهای کنترل؛ (B): کنترل+آهن؛ (C-H): کنترل+آهن+ ویتامین C در غلظت های ۲/۵، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰ و ۶۴۰ میکرومول در لیتر.

* اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل ($p < 0.05$)
* اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل+آهن ($p < 0.05$)



نمودار ۳: دامنه (حداکثر و حداقل)، صدکهای ۲۵، ۷۵ و میانه اثر غلظت های مختلف ویتامین E بر آسیب DNA ناشی از ۱۶۰ میکرومول در لیتر آهن بصورت Fe³⁺/NTA در سلولهای Caco-2. (A): سلولهای کنترل؛ (B): کنترل+آهن؛ (C-H): کنترل+آهن+ویتامین E در غلظت های ۲/۵، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰ میکرومول در لیتر. * اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل (p < 0.05). ** اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل+آهن (p < 0.05).



نمودار ۴: دامنه (حداکثر و حداقل)، صدکهای ۲۵، ۷۵ و میانه اثر غلظت های مختلف β -کاروتن بر آسیب DNA ناشی از ۱۶۰ میکرومول در لیتر آهن بصورت Fe³⁺/NTA در سلولهای Caco-2. (A): سلولهای کنترل؛ (B): کنترل+آهن؛ (C-H): کنترل+آهن+ β -کاروتن در غلظت های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۶ و ۱۲ میکرومول در لیتر. * اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل (p < 0.05). ** اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل+آهن (p < 0.05).

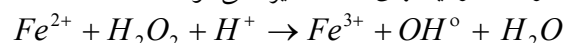
بحث

آهن به تنهایی اثر معنی‌دار در ایجاد آسیب در DNA سلولهای اسپرم داشت (۸). دلایل اصلی این تفاوتها می‌تواند بخاطر تفاوت در شرایط آزمایشگاهی و تفاوت در نوع سلولهای مورد مطالعه باشد. مطالعه ما نشان داد که ویتامین‌های C, E و β -کاروتن به صورت مشابهی بر آسیب DNA ناشی از آهن (Fe³⁺/NTA) عمل می‌کنند. در هر سه مورد شبیه حرف U ابتدا کاهش آسیب DNA و سپس افزایش آنرا داریم، البته به استثنای β -کاروتن که اثر آن در کاهش آسیب DNA معنی‌دار نبود. اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های فوق در مطالعات *In vitro* و *In vivo* متعددی مشاهده شده است (۱۵-۱۲). مکمل روزانه ویتامین‌های C, E و β -کاروتن برای ۲۰ هفته باعث کاهش آسیب DNA ناشی از H₂O₂ در لئوسیت‌های انسانی شده است (۱۲). در مطالعه دیگری مکمل توکوفرول به تنهایی یا همراه با ویتامین C در رت‌های مبتلا به فقر آهن باعث محافظت سلولهای مجرای گوارشی از تخریب DNA به علت مکمل آهن، شده است (۱۸). مکانیزم‌هایی که این ویتامین‌ها به عنوان عامل محافظتی برای DNA عمل می‌کنند، شامل: حذف رادیکالهای آزاد مثل رادیکالهای هیدروکسیل و پراکسی، ممانعت از تشکیل اکسیژن مولکولی، ممانعت از جهش DNA، و نقش در ترمیم DNA است (۲۱، ۲۰، ۳۱). البته در بعضی مطالعات این ویتامین‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی از خود نشان نداده و حتی به صورت پروکسیدان (تسریع‌کننده واکنشهای اکسیداسیون) عمل کرده‌اند (۲۱-۱۶). Anderson و همکارانش (۱۶) در مقادیر کم اثر حمایتی و در مقادیر بالا اثر تخریبی ویتامین C را در آسیب DNA ناشی از H₂O₂ در لئوسیت‌ها نشان دادند. در مطالعه دیگری مکمل همزمان ویتامین C و آهن باعث آسیب DNA شده است (۱۸). برای ویتامین E و β -کاروتن هم خاصیت آنتی‌اکسیدانی پرواکسیدانی مطرح شده است (۱۹، ۱۸، ۳۲). خواص پرواکسیدانی این ویتامینها به آثاری چون: القای آنزیمی، افزایش تحرک آهن از پروتئین‌های متصل به آن در بدن، افزایش برداشت آهن توسط سلولها، احیای Fe³⁺ به Fe²⁺، تبدیل O₂⁻ به O₂ و در نتیجه تشدید واکنش فنتون، نسبت داده شده است (۳۵-۳۲).

نتیجه‌گیری

آهن (Fe³⁺) به صورت محلول و قابل جذب برای سلول باعث افزایش صدمه DNA در سلولهای Caco-2 می‌شود. ویتامین‌های C و E قادر به تعدیل این اثر در غلظت‌های کم هستند. برای β -کاروتن این کاهش معنی‌دار نیست. در غلظت‌های بالا هر سه ویتامین باعث افزایش آسیب DNA ناشی از آهن می‌شوند، به عبارت دیگر این سه ویتامین در غلظت‌های بالا به عنوان پرواکسیدان عمل می‌کنند. امروزه توصیه مصرف مکمل‌های آهن با ویتامین‌ها (به‌خصوص ویتامین C) می‌شود، یافته‌های ما در مدل *In vitro* روی سلولهای کارسینومایی کولون نشانگر لزوم انجام مطالعات بیشتر در این زمینه بخصوص روی مدل انسانی است.

مطالعه حاضر نشان داد که آهن (Fe³⁺) به تنهایی هیچ اثری در DNA ندارد، در حالیکه همراه با NTA (Fe³⁺/NTA) باعث آسیب DNA در مقادیر بالاتر از ۱۶۰ میکرومول بعد از ۰/۵ ساعت انکوباسیون می‌شود. در توجیه عدم اثر Fe³⁺ به تنهایی بر روی DNA می‌توان گفت این شکل آهن قابل حصول برای سلولهای Caco-2 نیست، مخصوصاً وقتی pH محیط کشت (pH=۷/۴) در نظر گرفته شود این مطلب واضحتر می‌شود، زیرا که Fe³⁺ در pH های بالاتر از ۴ تا حد زیادی (بیش از ۹۵٪) از محیط خارج می‌شود (۲۹). NTA از عوامل شلاته‌کننده آهن است و از رسوب آن در محیط جلوگیری می‌کند، به نظر می‌رسد آهن همراه NTA بدلیل اینکه به صورت محلول در محیط می‌ماند، قابل جذب برای سلولهای Caco-2 است. با توجه به اینکه NTA ماده‌ای است که در سلول متابولیزه نمی‌شود (۳) و در مطالعه ما NTA به تنهایی تا مقدار ۱۱۴۰ میکرومول اثری در آسیب‌رسانی به DNA نداشت، لذا می‌توان نتیجه گرفت که شکل محلول آهن باعث آسیب DNA می‌شود. در مطالعات مختلف نتایج شبیه یافته ما به دست آمده است: Toyokuni و همکارانش (۳)، نشان دادند که آهن به شکل Fe³⁺ تا حد ۰/۵ میلی‌مول، به تنهایی اثری بر روی DNA سلولهای توپولار کلیوی ندارد. آندرسون و همکارانش (۷) در مطالعه روی لئوسیت‌ها نیز اثری از Fe³⁺ را به تنهایی در آسیب‌رسانی به DNA مشاهده نکردند. در این مطالعه Fe²⁺ بر خلاف Fe³⁺ باعث تخریب DNA می‌شد. Nunez و همکارانش (۹) در سلولهای Caco-2 نشان دادند که محیط کشت حاوی ۵۰ میکرومول Fe³⁺ به همراه NTA باعث آسیب DNA می‌شود در حالیکه در مقادیر ۵ میکرومول اثری در آسیب‌رسانی به DNA ندارد. Gleis و همکارانش (۱۰) در مطالعه بر روی سلولهای سرطانی کولون (HT-29) نشان دادند ۲۵۰ میکرومول Fe³⁺ به همراه NTA باعث آسیب DNA می‌شود. در مطالعات بر روی سلولهای دیگر چون هپاتوسیت رت و هامستر چینی یافته‌هایی مشابه به دست آمده است (۴ و ۱۱). در توجیه اثر آهن بر DNA گفته می‌شود آهن از طریق واکنش فنتون - طبق معادله زیر - باعث تولید رادیکالهای آزاد از جمله رادیکالهای فعال اکسیژن می‌شود:



رادیکالهای فعال اکسیژن تولید شده می‌توانند آغازگر واکنشهای زنجیره‌ای باشند که سر آخر به DNA آسیب می‌رسانند و یا خود مستقیماً باعث آسیب DNA شوند. نتیجه این واکنشها بروز سرطان می‌تواند باشد (۳۰). طبق معادله فوق، آهن دو ظرفیتی در واکنش دخالت دارد لذا می‌توان گفت که هر عاملی که به نحوی باعث تشدید تبدیل Fe³⁺ به Fe²⁺ شود، می‌تواند واکنش فنتون را تشدید نماید. البته در بعضی مطالعات نتایج متناقض هم به دست آمده است. در یک مطالعه (۳) بر خلاف مطالعه ما آهن حتی همراه با NTA هم اثر سویی بر DNA نداشت. در مطالعه دیگری

تقدیر و تشکر

بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آقای دکتر بهزاد فروتن، دکتر Cesar Fallque، شورای فرهنگی انگلیس در تهران، گروه علوم زیست پزشکی دانشگاه برادفورد انگلیس و دانشکده

بهداشت و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز که نهایت همکاری را در اجرای تحقیق داشتند، ابراز می‌داریم.

References

1. Eller MS, Dstrom k, Gilchrest BA. DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93** (3): 1087-1092.
2. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; **339** (1): 37-59.
3. Toyokuni S, Sagripanti JL. DNA Single-and double-strand breaks produced by Ferric nitritriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; **14**(2): 223-227.
4. Hartwig A, Schlepegrell R. Induction of oxidative DNA damage by ferric iron in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1995; **16** (12): 3009- 3013.
5. Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Anger JP, Cillard P, Morel I. Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis* 1998; **19** (6): 1053-1059.
6. Anderson D, Yardley-Jones A, Hambly RJ, Vives-Bauza C, Smykatz-Kloss V, Chua-Anusorn W, Webb J. Effects of iron salts and haemosiderin from a thalassemia patient on oxygen radical damage as measured in the comet assay. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 2000; **20** (1): 11-26.
7. Anderson D, Yardley- Jones A, Vives-Bauza C, Chua- Anusorn W, Cole C, Webb J. Effect of iron salts, haemosiderins, and chelating agents on the lymphocytes of a thalassaemia patient without chelation therapy as measured in the Comet assay. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 2000; **20** (5): 251-264.
8. Wellejus A, Poulsen HE, Loft S. Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells In vivo and In vitro. *Free Radic Res* 2000; **32** (1): 75-83.
9. Nunez MT, Tapia V, Toyokuni S, Okada S. Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (Caco -2) cells. *Free Radic Res* 2001; **34** (1): 57-68.
10. Glei M, Latunde-Dada GO, Klinder A, Becker TW, Hermann U, Voigt K, Pool- Zobel BL. Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT 29 clone 19 A. *Mutat Res* 2002; **519** (1&2): 151-161.
11. Iqbal M, Sharma SD, Mizote A, Fujisawa M, Okada S. Differential role of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides in augmenting ferric nitritriacetate (Fe-NTA)-mediated DNA damage: Implications for carcinogenesis. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 2003; **1** (Suppl.) 13-21.
12. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996; **56** (6): 1291-5.
13. Konopacka M, Rzeszowska - Wolny J. Antioxidant Vitamins C, E and β -Carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 2001;**491** (1&2):1-7.
14. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. The Effect of ascorbate and α - tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 1999; **14** (5): 505-511.
15. Wozniak K, Arabski M, Maleckapanas E, Drzewoski J, Blasiak J. DNA damage in human colonic mucosa cells induced by bleomycin and the protective action of vitamin E. *Cell Mol Biol Lett* 2004; **9** (1): 31-45.
16. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat Res* 1994; **307** (1): 261-271.
17. Carr A, Frei B. Dos vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999;**13** (9): 1007-1024.
18. Srigiridhar K, Nair KM. Supplementation with a-tocopherol or a combination of a- tocopherol and ascorbic acid protects the gastrointestinal tract of iron- deficient rats against iron- induced oxidative damage during iron repletion. *Br J Nutr* 2000; **84** (2): 165-173.
19. Palozza P, Calviello G, Serini S, Maggiano N, Lanza P, Ranelliotti FO, Bartoli G M. β - Carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Rad Biol Med* 2001; **30** (9): 1000-1007.
20. Zhang P, Omaye ST. DNA Strand breakage and oxygen tension: effects of β - carotene, a-tocopherol and ascorbic acid. *Food Chem Toxicol* 2001; **39** (3): 239-246.
21. Franke SIR, Prá D, da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutat Res* 2005; **583** (1): 75-84.

22. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 1977; **58** (2): 209-214.
23. 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.
24. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Haetmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; **35** (3):206-221.
25. Lund EK, Wharf SG, Fairweather-Tait SJ, Johnson IT. Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1999; **69** (2): 250-255.
26. Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 2001; **475** (1&2): 29-35.
27. Cherubini A, Martin A, Andres-Lacueva C, Di Iorio A, Lamponi M, Mecocci P, et al. Vitamin E levels, cognitive impairment and dementia in older persons: the InCHIANTI study. *Neurobiol Aging* 2005; **26** (7): 987-94.
28. Lovell DP, Thomas G, Dubow R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1999; **19** (1): 109-119.
29. Conrad ME, Umbreit JN. Iron absorption and transport-an update. *Am J Hematol* 2000; **64** (4): 287-298.
30. McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol* 1998; **35** (1): 5-12.
31. Claycombe KJ, Meydani SN. Vitamin E and genome stability. *Mutat Res* 2001; **475** (1&2): 37-44.
32. Lawlor SM, O'Brien NM. Modulation of oxidative stress by β -carotene in chicken embryo fibroblasts. *Br J Nutr* 1995; **73** (6): 841-850.
33. Garcia-Casal MN, Leets I, Layrisse M. β -carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr* 2000; **130** (1): 5-9.
34. Paolini M, Pozzetti L, Pedulli GF, Marchesi E, Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci* 1999; **64** (23): 273-278.
35. Schwartz JL. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J Nutr* 1996; **126** (4 suppl.): 1221S-1227S.