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

اثر ویتامین های C، E 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
پروفسوردیانا آندرسون: استاد دانشگاه برادفورد انگلیس

دریافت: ۸۴/۵/۲۳، پذیرش: ۸۴/۸/۲۵

چکیده

زمینه و اهداف: نقش آهن و ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان 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 (Nitrilotriacetic Acid, NTA) در آسیب رسانی به DNA و اثر ویتامین‌های C , E 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 اندازه‌گیری شد. برای مرحلهٔ دوم مطالعه سلولها با یک مقدار ثابت از آهن(۱۶۰ میکرومول در لیتر) و NTA همراه با مقادیر مختلف از ویتامین‌های 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 اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: 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 درDNA می شود. ویتامین‌های C و E در دوزهای کم (به ترتیب: ۲/۵ و ۱۰-۲/۵ 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 غلظت‌های بالاتر باعث افزایش آسیب DNA می‌شدند ($p < ۰/۰۵$).

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

کلیدواژه‌ها: آزمون Comet، آسیب DNA، آهن، ویتامین‌های C , E و β–کاروتن

مقدمه

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 , H2O2 و ... ایجاد می‌شود(۲). از عوامل دیگری که می‌توانند باعث صدمه و آسیب DNA شوند می‌توان به عوامل تغذیه‌ای 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 (Fe2+ , Fe3+)، نمک مورد استفاده از آن (سولفات، کلراید) و استفاده یا عدم استفاده از عوامل شلاته کننده چون اسید نیتریلوتری استیک نتایج متناقضی به دست آمده است (۱۱-۳).

از طرف دیگرویتامین‌های 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 ویتامین‌ها ـ 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

تصمیم گرفته شد: اولاً: اثر آهن به تنهایی و همراه با NTA در مقادیر مختلف بر DNA ارزیابی شود. ثانیاً: اثر ویتامین‌هایC , E 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 می دهند، لذا به عنوان مدل مخاطی روده تعریف شده اند (۲۳). روش Comet به عنوان روشی ساده، مناسب و حساس جهت بررسی آسیب و صدمه DNA مطرح شده است(۲و۲۴).

مواد و روش ها

-آماده‌سازی سلولهای Caco- 2. سلولها در محیط کشت MEME[1] 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 $37^{o}c$ با ۵٪ CO_2 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 فسفاته (PBS)[2] ، حاوی ۵۸ میلی مول در لیترNa_2HPO_4، ۱۷ میلی مول در لیترNaH_2PO_4 ، و ۶۸ میلی مول 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 آهنIII – و یا همراه با NTA (آهن /NTA : نسبت مولی ۱ به ۲) برای ۰/۵ ساعت در انکوباتورقرار داده شدند. محلول آهن–NTA با مخلوط کردن کلرید آهنIII در HCl یک نرمال و نیتریلوتری استیک اسید در آب مقطر تهیه شد.

Lund و همکارانش (۲۵) نشان داده اند که آهن مکمل مقدار آهن آزاد در مدفوع را تا ۳۰۰ میلی مول افزایش می دهد، لذا در این مطالعه از مقادیر بالا استفاده شد. بعد از انکوباسیون، سلولها با محلول بافری فسفاته شسته شدند. سپس بامحلول تریپسین ـ 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 (۳۲۰–۰میکرومول در لیتر)، ویتامین E (۳۲۰–۰میکرومول در لیتر)، و یا β- کاروتن(۱۲–۰میکرومول در لیتر) به همراه یک مقدار ثابت آهن (۱۶۰میکرومول در لیتر) برای نیم ساعت در انکوباتور قرارداده شدند. مقادیر پلاسمایی ویتامین های C، ویتامین E، و β- کاروتن به ترتیب : ۹۰–۲۰ ، ۳۵–۱۹، و۱ –۰/۲۵ میکرومول در لیتر هستند(۱۹، ۲۶و ۲۷)، لذا مقادیر مورد استفاده در مطالعه ما در حدود مقادیر فیزیولوژیک بود. غلظت‌های اولیه از ویتامین های C ، E 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.

بعد از انکوباسیون و تریپسیناسیون 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، خنثی‌سازی و رنگ‌آمیزی اسلایدها به صورت کامل بر اساس روش های توصیف شده و استاندارد انجام گرفت (۶، ۷و 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 لیز کننده حاوی تریتون و دی متیل سولفواکسید لیز شد، سپس الکتروفورز برای ۲۰ دقیقه در ۲۶ ولت و ۳۰۰ میلی آمپر انجام گرفت. عمل خنثی سازی با بافر تریس انجام شد، سپس عمل رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت، وسر آخر نتایج بررسی گردیدند.

– *بررسی نتایج آزمون Comet*. نتایج آزمایشات با استفاده از برنامهٔ 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(حداکثروحداقل) وصدکهای ۲۵ و ۷۵ است، ارائه شدند. با توجه به عدم توزیع نرمال نتایج و تکرار آزمایش (n=٤) برای هر مقدار، آزمونهای آماری یکطرفه ANOVA و من وشی جهت بررسی اثر ویتامین های C، ویتامین E و β- کاروتن بر آسیب DNA ناشی ازآهن (Fe^{3+}/NTA) انجام گرفت. آزمونهای آماری با استفاده از برنامه SPSS 11 انجام گرفت. نتایج در سطح $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

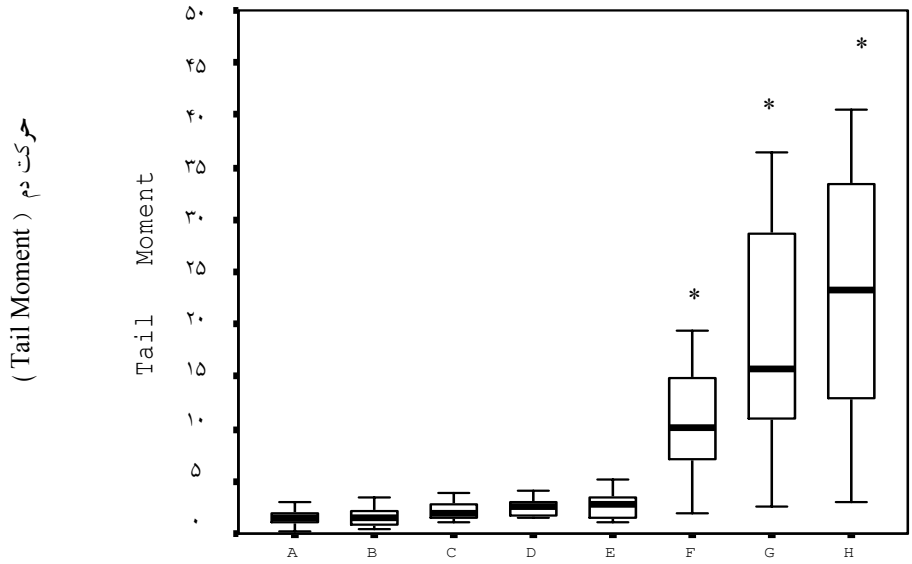
درصد سلولهای زنده بیش از ۹۰ در صد بود. اتانول و استون در غلظت‌های مورد استفاده جهت تهیه غلظت‌های اولیه از ویتامینهای E و β- کاروتن اثری بر DNA نداشتند. آهن به تنهایی به صورت $FeCl_3$ در دوزهای ۶۲۰–۰ میکرومول در لیتر و NTA به تنهایی در غلظت‌های ۱۲۴۰–۰ میکرومول در لیتر اثر معنی‌داری در ایجاد صدمه و آسیب بر روی DNA نداشتند.

نتایج اثر آهن به شکل Fe^{3+} همراه NTA(Fe^{3+}/NTA) در نمودار ۱ آورده شده است. آهن در مقادیر بیش از ۱۶۰ میکرو مول در لیتر اثر معنی‌داری در ایجاد آسیب DNA در سلولهای Caco-2 داشت، لذا برای قسمت دوم مطالعه از این مقدار استفاده شد.

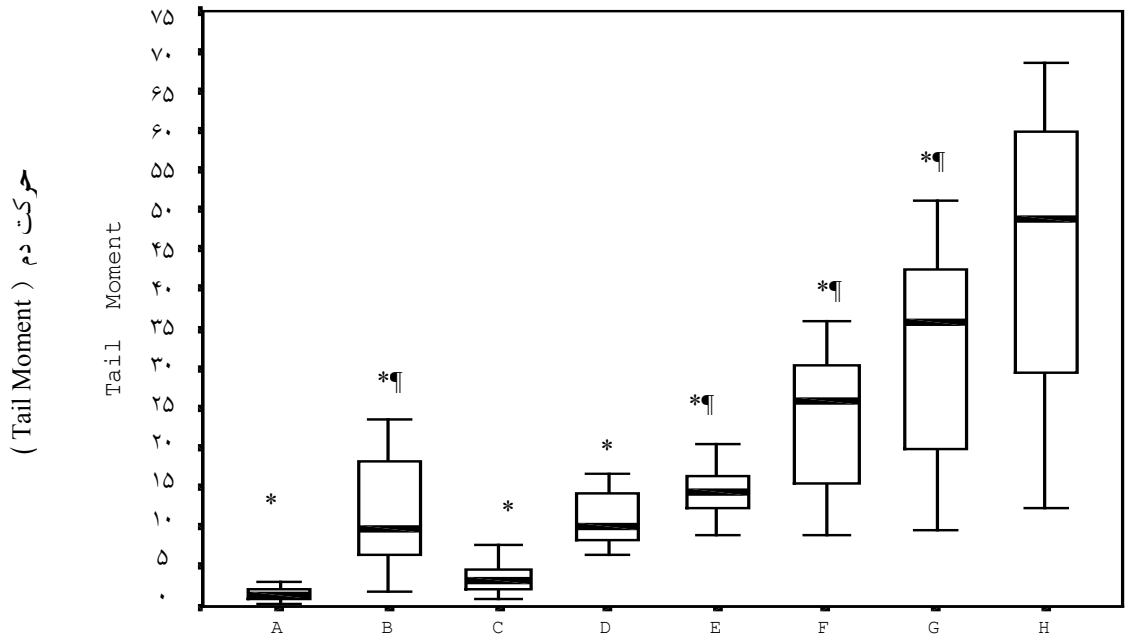
نتایج اثر ویتامین‌های C، E و β- کاروتن بر آسیب DNA ناشی از ۱۶۰ میکرومول در لیتر آهن به شکل Fe^{3+}/NTA ، در

1. Minimum Essential Medium Eagle, MEME
2. Phosphate Buffered Solution, PBS

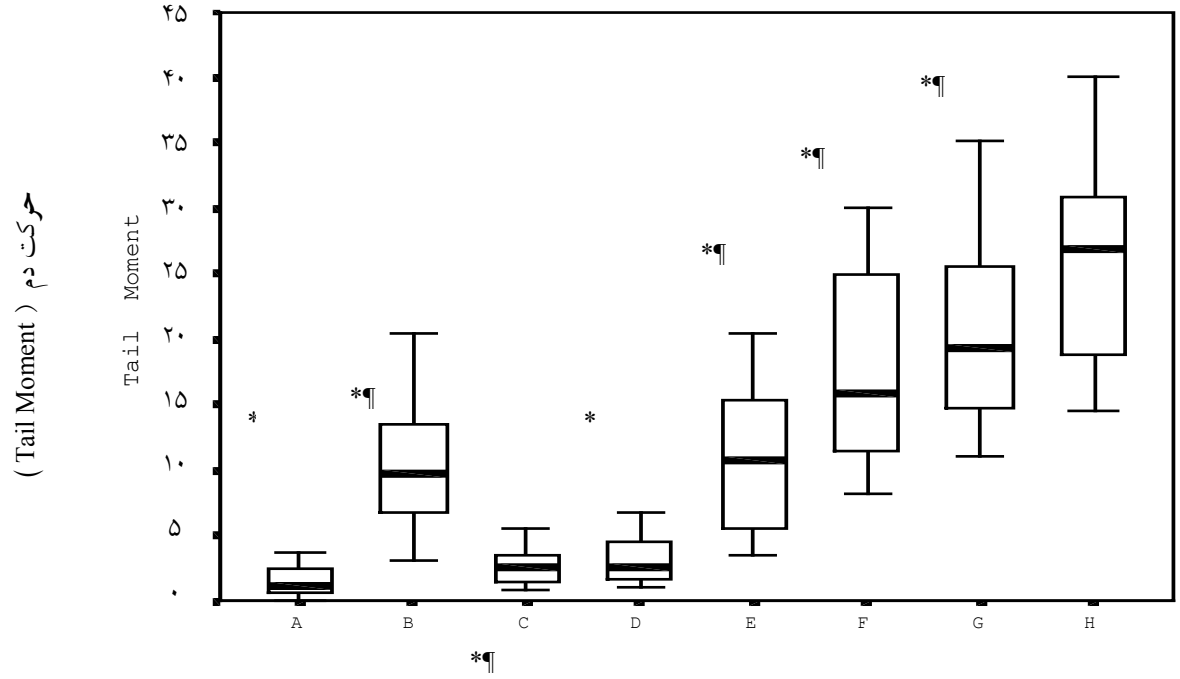
نمودارهای ٤-۲ آورده شده است. ویتامین C در دوز ۲/۵ میکرومول در لیتر باعث کاهش معنی دار در آسیب DNA ناشی از آهن می شد، در حالیکه در بقیه دوزهای مورد استفاده باعث تشدید آسیب ناشی از آهن می گردید($p < ۰/۰۵$). ویتامین E در مقادیر بیشتری (۱۰-۲/۵) نسبت به ویتامین C اثر کاهندگی آسیب DNA ناشی از آهن را نشان می 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 ($p <۰/۰۵$).



نمودار ۱: دامنه(حداکثر و حداقل)، صدکهای ۲۵، ۷۵ و میانه اثرآهن بصورت Fe^{3+}/NTA برآسیب رسانی به DNA درسلولهای 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 داربا میانه گروه کنترل($p <0.05$).



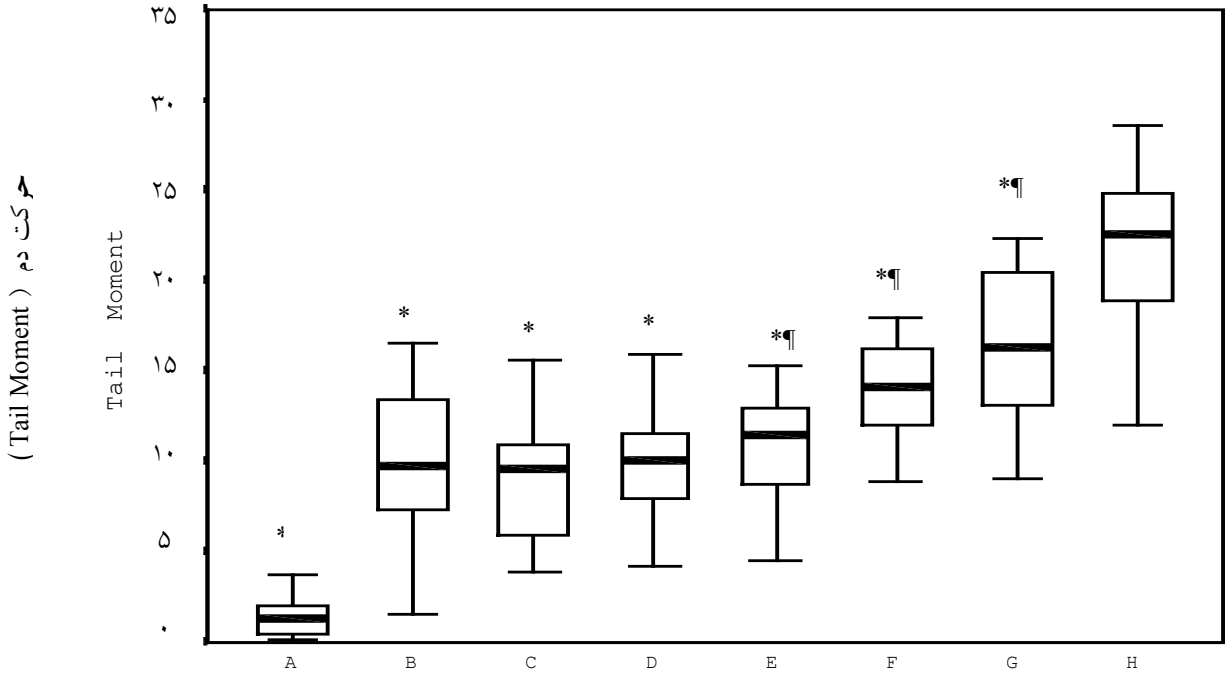
نمودار ۲: دامنه(حداکثر و حداقل)، صدکهای ۲۵، ۷۵ و میانه اثر غلظت های مختلف ویتامین C بر آسیب DNA ناشی از ۱۶۰ میکرومول در لیتر آهن بصورت Fe^{3+}/NTA درسلولهای Caco-2. (A):سلولهای کنترل؛ (B):کنترل+آهن؛ (C-H):کنترل+آهن+ ویتامین C در غلظت های ۲/۵ ،۱۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرومول در لیتر .
*. اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل($p <0.05$).
¶. اختلاف معنی دار با میانه گروه کنترل+آهن ($p<0.05$).



نمودار 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 Fe^{3+}/NTA درسلولهای Caco-2. (A):سلولهای کنترل؛ (B):کنترل+آهن؛ (C-H): کنترل+آهن+ ویتامین E در غلظت های ۲/۵، ۱۰،۱۶۰،۸۰،۴۰ و 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 Fe^{3+}/NTA درسلولهای 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

مطالعه حاضر نشان داد که آهن (Fe^{3+}) به تنهایی هیچ اثری در DNA ندارد، در حالیکه همراه با NTA (Fe^{3+}/NTA) باعث آسیب DNA در مقادیر بالاتر از ۱۶۰ میکرومول بعد از ۰/۵ ساعت انکوباسیون می‌شود. در توجیه عدم اثر Fe^{3+} به تنهایی بر روی DNA می‌توان گفت این شکل آهن قابل حصول برای سلولهای Caco-2 نیست، مخصوصاًوقتی pH محیط کشت (pH=۷/٤) در نظر گرفته شود این مطلب واضحتر می‌شود، زیرا که Fe^{3+} در pH های بالاتر از ٤ تا حد زیادی (بیش از ۹۵٪) از محیط خارج می‌شود(۲۹). NTA از عوامل شلاته کننده آهن است و از رسوب آن در محیط جلوگیری می‌کند، به نظر می‌رسد آهن همراه NTA بدلیل اینکه به صورت محلول در محیط می ماند، 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 ۱۱٤۰ میکرومول اثری در آسیب‌رسانی به DNA نداشت، لذا می توان نتیجه گرفت که شکل محلول آهن باعث آسیب DNA می شود. در مطالعات مختلف نتایج شبیه یافته ما به دست آمده است: Toyokuni و همکارانش(۳)، نشان دادند که آهن به شکل Fe^{3+} تا حد ۰/۵ میلی مول، به تنهایی اثری بر روی DNA سلولهای توبولار کلیوی ندارد. آندرسون و همکارانش(۷) در مطالعه روی لنفوسیت‌ها نیز اثری از Fe^{3+} را به تنهایی در آسیب‌رسانی به DNA مشاهده نکردند. در این مطالعه Fe^{2+} بر خلاف Fe^{3+} باعث تخریب DNA می شد. Nunez و همکارانش(۹) در سلولهای Caco-2 نشان دادند که محیط کشت حاوی ۵۰ میکرومول Fe^{3+} به همراه NTA باعث آسیب DNA می‌شود در حالیکه در مقادیر ۵ میکرومول اثری در آسیب‌رسانی به DNA ندارد. Glei و همکارانش(۱۰) در مطالعه بر روی سلولهای سرطانی کولون (HT-29) نشان دادند ۲۵۰ میکرومول Fe^{3+} به همراه NTA باعث آسیب DNA می شود. در مطالعات بر روی سلولهای دیگر چون هپاتوسیت رت و هامستر چینی یافته‌هایی مشابه به دست آمده است (۴و۱۱). در توجیه اثر آهن بر DNA گفته می‌شود آهن از طریق واکنش فنتون ـ طبق معادله زیر ـ باعث تولید رادیکالهای آزاد از جمله رادیکالهای فعال اکسیژن می‌شود:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\circ} + H_2O$$

رادیکالهای فعال اکسیژن تولید شده می‌توانند آغازگر واکنشهای زنجیره ای باشند که سر آخر به DNA آسیب می رسانند و یا خود مستقیماً باعث آسیب DNA شوند. نتیجه این واکنشها بروز سرطان می تواند باشد(۳۰). طبق معادله فوق، آهن دو ظرفیتی در واکنش دخالت دارد لذا می توان گفت که هر عاملی که به نحوی باعث تشدید تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} شود، می تواند 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 مطابعه دیگری آهن به تنهایی اثر معنی‌دار در ایجاد آسیب در DNA سلولهای اسپرم داشت(۸). دلایل اصلی این تفاوتها می تواند بخاطر تفاوت در شرایط آزمایشگاهی و تفاوت در نوع سلولهای مورد مطالعه باشد. مطالعهٔ ما نشان داد که ویتامین‌های C , E و β–کاروتن به صورت مشابهی بر آسیب DNA ناشی از آهن (Fe^{3+}/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 آنتی اکسیدانی 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 H_2O_2 در لنفوسیت‌های 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). مکانزیم هایی که این ویتامین ها به عنوان عامل محافظتی برای DNA عمل می کنند، شامل: حذف رادیکالهای آزاد مثل رادیکالهای هیدروکسیل وپراکسی، ممانعت از تشکیل اکسیژن مولکولی، ممانعت ازجهش DNA، و نقش در ترمیم DNA است(۲۱،۲۰و۳۱). البته در بعضی مطالعات این ویتامین‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی از خود نشان نداده و حتی به صورت پروکسیدان (تسریع کننده واکنشهای اکسیداسیون) عمل کرده اند (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 H_2O_2 در لنفوسیت ها 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 آنتی اکسیدانی و پرواکسیدانی مطرح شده است(۱۸،۱۹و۳۲). خواص پرواکسیدانی این ویتامینها به آثاری چون: القای آنزیمی، افزایش تحرک آهن از پروتئین های متصل به آن در بدن، افزایش برداشت آهن توسط سلولها، احیای Fe^{3+} بهFe^{2+} ، تبدیل O_2 به$O_2^{\cdot -}$ و در نتیجه تشدید واکنش فنتون، نسبت داده شده است(۳۵–۳۲).

نتیجه‌گیری

آهن (Fe^{3+}) به صورت محلول و قابل جذب برای سلول باعث افزایش صدمه DNA در سلولهای Caco-2 می شود. ویتامین‌های C وE قادر به تعدیل این اثر در غلظت‌های کم هستند. برای β–کاروتن این کاهش معنی‌دار نیست. در غلظت های بالا هر سه ویتامین باعث افزایش آسیب DNA ناشی از آهن می شوند، به عبارت دیگر این سه ویتامین در غلظت های بالا به عنوان پرواکسیدان عمل می کنند. امروزه توصیه مصرف مکمل های آهن با ویتامین ها (بخصوص ویتامین C) می شود، یافته های ما در مدل In vitro روی سلولهای کارسینومایی کولون نشانگر لزوم انجام مطالعات بیشتر در این زمینه بخصوص روی مدل انسانی است.

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 nitrilotriacetate 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 talassemia 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 nitrilotriacetate (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, Ranellietti 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, $FeSO_4$ and $CuSO_4$ 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.