

# Strategies to increase safety and efficacy of iron interventions in African infants

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Mikulic, Nadja

**Publication date:**

2021

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000483044>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH No. 27440

**STRATEGIES TO INCREASE SAFETY AND EFFICACY OF IRON  
INTERVENTIONS IN AFRICAN INFANTS**

A thesis submitted to attain the degree of  
**DOCTOR OF SCIENCES** of ETH ZURICH

(Dr. Sc. ETH Zurich)

Presented by

**Nadja Mikulic**

MSc ETH Zurich in Food Science, Zurich, Switzerland

Born on 08.10.1992

Citizen of Austria

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael B. Zimmermann, MD, examiner

Dr. Nicole U. Stoffel, co-examiner

Dr. Jeannine Baumgartner, co-examiner

Prof. Dr. Berthold Koletzko, MD, co-examiner

2021

## SUMMARY

### **Background**

Infants and young children in developing countries have high prevalence rates of iron deficiency anemia (IDA), which adversely affect their growth and cognitive development. IDA is widespread in sub-Saharan Africa and is a leading contributor to the global burden of disease. In-home iron fortification of complementary foods using micronutrient powders (MNPs) reduces the risk for IDA by ensuring that the iron needs of infants and young children are met without changing their traditional diet. However, MNPs may increase the risk for severe diarrhea and hospitalization because of their relatively high iron dose. Typically, <10% is absorbed in the duodenum, resulting in most of the dietary iron passing unabsorbed into the colon, where it may adversely affect the infant and child gut microbiota and may increase gut inflammation. Previous studies from our lab demonstrated that iron containing MNPs adversely affect the African infant gut microbiome, decreasing beneficial barrier commensals, while increasing enterobacteria and gut inflammation. Thus, there is an urgent need to find safer formulations of iron fortification for African infants and children.

### **Research objective**

The overall aim of this doctoral thesis was to investigate new, safe, and efficacious approaches to deliver iron to help control IDA in African infants. This was applied by optimizing the timing of iron fortificants and supplements, and by studying the effect of two novel potential iron absorption enhancers, a prebiotic mixture of galacto-oligosaccharides (GOS) and fructo-oligosaccharides (FOS) and the iron-binding protein lactoferrin (Lf).

### **Original studies**

#### *Manuscript 1*

The aim of the stable iron isotope studies in Kenyan infants and young children aged 5-14 months presented in Manuscript 1 was to compare iron absorption from morning and afternoon iron doses and from consecutive, alternate and every third day iron dosing.

In three randomized-entry, prospective crossover studies, we measured and compared iron absorption and plasma hepcidin response from 1) meals fortified with a 12-mg iron MNP given

in the morning and afternoon ( $n = 22$ ); 2) the same given on consecutive and alternate days ( $n = 21$ ); and 3) a 12-mg iron supplement given on alternate days and every third day ( $n = 24$ ).

In mostly iron-deficient anemic Kenyan infants and young children given 12 mg oral iron, morning and afternoon doses were comparably absorbed, dosing on consecutive days increased plasma hepcidin and lowered iron absorption by 14%, while dosing on alternate days or every third day did not increase plasma hepcidin or decrease iron absorption.

### *Manuscript 2*

The objective of the stable iron isotope study in 25 Kenyan infants aged 3-6 months presented in Manuscript 2 was to compare iron absorption from bovine holo-Lf, bovine apo-Lf and ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ ).

In a randomized-entry, prospective crossover study, we measured and compared iron absorption from three maize-porridge meals containing 1) 1.41 g holo-Lf carrying 1.50 mg intrinsically labeled ferric citrate; 2) 1.41 g apo-Lf (containing 0.08 mg native iron) given with 1.42 mg of extrinsically labeled  $\text{FeSO}_4$ ; or 3) 1.50 mg of extrinsically labeled  $\text{FeSO}_4$ .

Iron absorption from the maize-porridge containing holo-Lf was comparable to that containing  $\text{FeSO}_4$  alone, and the addition of apo-Lf to the meal containing  $\text{FeSO}_4$  increased iron absorption by 56% compared to the meal containing  $\text{FeSO}_4$  alone.

### *Manuscript 3*

In 23 Kenyan infants and young children aged 6-14 months, we tested whether the addition of GOS has an acute effect on iron absorption from an MNP containing a mixture of ferrous fumarate ( $\text{FeFum}$ ) and sodium iron ethylenediaminetetraacetate ( $\text{NaFeEDTA}$ ), or  $\text{FeSO}_4$ .

In a randomized-entry, prospective crossover study, we measured iron absorption from four maize-porridge meals fortified with an MNP containing 5.0 mg labeled iron as 1) 2.5 mg  $\text{FeFum}$  + 2.5 mg  $\text{NaFeEDTA}$  without or 2) with 7.5 g GOS; or 3)  $\text{FeSO}_4$  without or 4) with 7.5 g GOS.

The addition of GOS to a single iron-fortified maize-porridge meal in mostly iron-deficient anemic Kenyan infants and young children did not significantly enhance iron absorption, suggesting that GOS did not have an acute effect on iron absorption and that long-term feeding of GOS may be needed to enhance iron absorption in infants and young children.

*Manuscript 4*

The aim of this 3-week intervention trial presented in Manuscript 4 was to assess the effect on iron absorption of a new wheat-based instant cereal without and with two different doses of a prebiotic mixture of GOS and FOS with a ratio 9:1 before and after a daily 3-week consumption in Kenyan infants aged 6-11 months. Furthermore, we investigated the effects of the daily consumption of the wheat-based instant cereal on iron status, and systemic and gut inflammation.

In a single-blind, randomized, controlled intervention trial, 167 infants aged 6-11 months were randomized to receive daily for 3 weeks the wheat-based instant cereal containing 3.6 mg FeFum, ascorbic acid (AA) (molar ratio iron and AA 1:4) and either 7.5 g of the prebiotic mixture (arm 1), 3 g of the prebiotic mixture (arm 2), or the identical cereal with no prebiotics (arm 3). A subset of infants (arm 1:  $n = 28$ ; arm 2:  $n = 31$ ) additionally consumed four stable iron isotope labeled cereal meals with 3.6 mg FeFum and AA without prebiotics and with prebiotics, two before and two after the 3-week daily consumption of the cereal.

In mostly iron-deficient anemic Kenyan infants, the addition of the prebiotic mixture increased iron absorption by 16% before, but not after, the 3-week intervention, and the daily consumption of the cereal containing the prebiotic mixture for 3 weeks increased iron absorption by 35% in the meal containing no prebiotics, and by 53% in the meal containing prebiotics, suggesting that the prebiotic mixture has an acute, chronic and additive effect on iron absorption. These effects were dose-independent, suggesting that a prebiotic dose of 3 g is as efficacious in enhancing iron absorption as 7.5 g. After the 3-week intervention, compared to the iron-only group, systemic and gut inflammation were lower in the low-prebiotic group and high-prebiotic group, respectively.

**Conclusion**

With this thesis, we have provided new insights into the regulation of iron absorption in African infants and young children, a key target group of iron fortification programs. Our data suggest that iron containing MNPs given to African infants throughout the day have comparable absorption, that alternate day dosing should be preferred to consecutive day dosing, that Lf can be used to improve the efficacy of iron fortificants, and that the addition of a prebiotic mixture containing GOS and FOS may be beneficial in this setting to increase iron bioavailability and, at the same time, reduce the adverse effects of iron on the infant gut.



## ZUSAMMENFASSUNG

### **Hintergrund**

Säuglinge und Kleinkinder in Entwicklungsländern weisen eine hohe Prävalenzrate an Eisenmangelanämie auf, die sich negativ auf ihr Wachstum und ihre kognitive Entwicklung auswirkt. Eisenmangelanämie ist in Afrika südlich der Sahara weit verbreitet und trägt massgeblich zur globalen Krankheitslast bei. Die Eisenanreicherung von Beikost zu Hause mit Mikronährstoffpulvern (MNP) verringert das Risiko für Eisenmangelanämie, indem sichergestellt wird, dass der Eisenbedarf von Säuglingen und Kleinkindern gedeckt wird, ohne dass die traditionelle Ernährung verändert wird. MNP können jedoch aufgrund ihrer relativ hohen Eisendosis das Risiko für Durchfallerkrankungen und Hospitalisierungen erhöhen. Normalerweise werden <10% des Eisens im Zwölffingerdarm absorbiert, was dazu führt, dass ein Grossteil nicht absorbiert in den Dickdarm gelangt, wo es die Darmflora von Säuglingen und Kleinkindern nachteilig beeinflussen und Darmentzündungen hervorrufen kann. Studien aus unserem Labor zeigten kürzlich, dass eisenhaltige MNP die Darmflora der afrikanischen Säuglinge und Kleinkinder negativ beeinflussen. Es kam zu einer Abnahme von nutzbringenden Bakterien und im Gegenzug zu einer Zunahme von Enterobakterien und Darmentzündungen. Es besteht daher ein dringender Bedarf, sicherere Formulierungen für die Eisenzufuhr für afrikanische Säuglinge und Kleinkinder zu finden.

### **Forschungsziele**

Das Hauptziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung eines neuen, sicheren und wirksamen Ansatzes zur Eisenverabreichung, der helfen kann, Eisenmangelanämie in afrikanischen Säuglingen und Kleinkindern zu verringern. Dies wurde angewendet, indem die zeitliche Koordinierung der Verabreichung von eisenangereicherter Nahrung und Nahrungsergänzungsmittel optimiert, und die Wirkung von zwei neuen potenziellen Eisenabsorptionsverstärkern, zum einen eine präbiotische Mischung aus Galactooligosacchariden (GOS) und Fructooligosacchariden (FOS) und zum anderen das eisenbindende Protein Lactoferrin (Lf), untersucht wurde.

## **Eigenständige Studien**

### *Manuskript 1*

Das Ziel der Studien mit stabilen Eisenisotopen an kenianischen Säuglingen und Kleinkindern im Alter von 5-14 Monaten, die in Manuskript 1 präsentiert sind, war es, die Eisenabsorption von Eisendosen am Morgen und am Nachmittag, sowie von aufeinanderfolgenden Tagen, an jedem zweiten und jedem dritten Tag zu vergleichen.

In drei randomisierten, prospektiven Crossover-Studien wurde die Eisenabsorption und Veränderung in der Plasma-Hepcidin-Konzentration nach dem Konsum von Mahlzeiten gemessen, die 1) mit einem MNP mit 12 mg Eisen angereichert und morgens und nachmittags verabreicht wurden ( $n = 22$ ); 2) mit demselben MNP angereichert und an aufeinanderfolgenden Tagen und an jedem zweiten Tag verabreicht wurden ( $n = 21$ ); oder 3) ein Nahrungsergänzungsmittel mit 12 mg Eisen enthielten und an jedem zweiten oder dritten Tag verabreicht wurden ( $n = 24$ ).

Bei überwiegend anämischen kenianischen Säuglingen und Kleinkindern mit Eisenmangel, denen 12 mg Eisen verabreicht wurden, wurden die Dosen am Morgen und Nachmittag vergleichbar absorbiert. Die Dosierung an aufeinanderfolgenden Tagen erhöhte die Plasma-Hepcidin-Konzentration, und senkte die Eisenabsorption um 14%, während die Dosierungen an jedem zweiten Tag und an jedem dritten Tag weder die Plasma-Hepcidin-Konzentration erhöhte, noch die Eisenabsorption verringerte.

### *Manuskript 2*

Das Ziel der Studie mit stabilen Eisenisotopen an 25 kenianischen Säuglingen im Alter von 3-6 Monaten, die in Manuskript 2 präsentiert ist, war es, die Eisenabsorption von Holo- und Apo-Lf, das ursprünglich vom Rind stammte, und Eisensulfat zu vergleichen.

In einer randomisierten, prospektiven Crossover-Studie wurde die Eisenabsorption von drei Maisbreimahlzeiten gemessen, die 1) 1.41 g Holo-Lf mit 1.50 mg intrinsisch markiertes Eisen(III)-Citrat; 2) 1.41 g Apo-Lf (das 0.08 mg natives Eisen enthielt) und 1.42 mg extrinsisch markiertes Eisensulfat; oder 3) 1.50 mg extrinsisch markiertes Eisensulfat enthielten.

Die Eisenabsorption von der Maisbreimahlzeit, die Holo-Lf enthielt, war vergleichbar mit der, die nur Eisensulfat enthielt. Die Zugabe von Apo-Lf zu der Maisbreimahlzeit, die nur Eisensulfat enthielt, erhöhte die Eisenabsorption um 56%.



*Manuskript 3*

In 23 kenianischen Säuglingen und Kleinkindern im Alter von 6-14 Monaten wurde getestet, ob die Zugabe von GOS einen akuten Einfluss auf die Eisenabsorption von einem MNP hatte, das entweder eine Mischung aus Eisenfumarat und Eisen(III)-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (NaFeEDTA), oder Eisensulfat enthielt.

In einer randomisierten, prospektiven Crossover-Studie wurde die Eisenabsorption aus vier Maisbreimahlzeiten gemessen, die mit einem MNP angereichert waren, das 5.0 mg markiertes Eisen als 1) 2.5 mg Eisenfumarat und 2.5 mg NaFeEDTA ohne oder 2) mit 7.5 g GOS; oder 3) Eisensulfat ohne oder 4) mit 7.5 g GOS enthielt.

Die Zugabe von GOS zu einer einzelnen mit Eisen angereicherten Maisbreimahlzeit bei überwiegend anämischen kenianischen Säuglingen und Kleinkindern mit Eisenmangel verbesserte die Eisenabsorption nicht, was darauf hindeutet, dass GOS keinen akuten Effekt auf die Eisenabsorption hat und dass möglicherweise eine langfristige Zufuhr von GOS erforderlich ist um die Eisenabsorption zu verbessern.

*Manuskript 4*

Das Ziel unserer dreiwöchigen Interventionsstudie war es, die Auswirkung eines neuen Instantgetreides auf Weizenbasis ohne und mit zwei verschiedenen Dosen einer präbiotischen Mischung aus GOS und FOS mit einem Verhältnis 9:1 bevor und nach einem täglichen 3-wöchigen Verzehr zu untersuchen. Darüber hinaus untersuchten wir die Auswirkungen des täglichen Verzehrs des Instantgetreides auf den Eisenstatus, systemische Entzündungen und Darmentzündungen.

In einer einfachblinden, randomisierten, kontrollierten Interventionsstudie wurden 167 Säuglinge im Alter von 6-11 Monaten zufällig zugeteilt, täglich während drei Wochen das Instantgetreide auf Weizenbasis, das 3.6 mg Eisenfumarat und Ascorbinsäure (Molverhältnis Eisen zu Ascorbinsäure 1:4) enthielt, entweder mit 7.5 g der präbiotischen Mischung (Arm 1), 3 g der präbiotischen Mischung (Arm 2) oder ohne der präbiotischen Mischung (Arm 3) zu konsumieren. Eine Untergruppe der Säuglinge (Arm 1:  $n = 28$ ; Arm 2:  $n = 31$ ) konsumierte zusätzlich vier mit stabilen Eisenisotopen markierte Mahlzeiten mit 3.6 mg Eisenfumarat und Ascorbinsäure ohne Präbiotika und mit Präbiotika, zwei vor und zwei nach dem 3-wöchentlichen täglichen Verzehr des Instantgetreides.

Bei überwiegend anämischen kenianischen Säuglingen mit Eisenmangel erhöhte die Zugabe der präbiotischen Mischung die Eisenabsorption vor, jedoch nicht nach, dem 3-wöchigen täglichen Verzehr um 16%, und der 3-wöchige tägliche Verzehr des Instantgetreides, die die präbiotische Mischung enthielt, erhöhte die Eisenabsorption um 35% in der Mahlzeit ohne Präbiotika und um 53% in der Mahlzeit mit Präbiotika, was darauf hindeutet, dass die präbiotische Mischung eine akute, chronische und additive Wirkung auf die Eisenabsorption hat. Diese Effekte waren dosisunabhängig, was darauf hindeutet, dass eine präbiotische Dosis von 3 g die Eisenabsorption ebenso wirksam verbessert wie eine Dosis von 7.5 g. Nach der 3-wöchigen Intervention waren im Vergleich zur Gruppe ohne Präbiotika die systemischen Entzündungswerte und Darmentzündungswerte niedriger in der 3-g-Präbiotikgruppe beziehungsweise der 7.5-g-Präbiotikgruppe.

### **Schlussfolgerungen**

Mit dieser Doktorarbeit konnten wir neue Einblicke in die Regulierung der Eisenabsorption bei afrikanischen Säuglingen und Kleinkindern, einer wichtigen Zielgruppe von Eisenanreicherungsprogrammen, geben. Unsere Daten legen nahe, dass eisenhaltige MNP, die afrikanischen Säuglingen und Kleinkindern sowohl morgens als auch nachmittags verabreicht werden, eine vergleichbare Absorption aufweisen, dass eine Eisendosierung alle zwei Tage einer Dosierung an aufeinanderfolgenden Tagen vorzuziehen ist, dass Lf zur Verbesserung der Wirksamkeit von eisenangereicherter Nahrung verwendet werden kann und dass die Zugabe von einer präbiotischen Mischung aus GOS und FOS vorteilhaft sein kann um die Bioverfügbarkeit von Eisen zu erhöhen und gleichzeitig die nachteiligen Auswirkungen von Eisen auf den Darm des Säuglings und Kleinkindes zu verringern.