IRON BIOAVAILABILITY OF DATES (*PHOENIX DACTYLIFERA*) AND GOAT MILK AND THEIR EFFECTS ON IRON DEFICIENCY ANAEMIA

NURUL NADIAH BINTI MAD ZAHIR

UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

IRON BIOAVAILABILITY OF DATES (*PHOENIX DACTYLIFERA*) AND GOAT MILK AND THEIR EFFECTS ON IRON DEFICIENCY ANAEMIA

Nurul Nadiah Binti Mad Zahir

Thesis submitted in fulfilment for the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY IN SCIENCE AND TECHNOLOGY

Faculty of Medicine and Health Sciences
UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

August 2023

ACKNOWLEDGEMENT

All praise to Allah s.w.t., the Most Merciful, the All-knowing, the All-Seeing and All hearing that without His blessing, I would not be able to complete this thesis. This work would not be possible without the help and support of many people. Completing this Ph.D. has been a gratifying and challenging experience and has changed my outlook on my research career ahead.

First and foremost, I would like to thank all those who have supervised my work since I started my Ph.D. I owe a huge gratitude to my supervisor Dr. Noor Fadzilah binti Zulkifli, who has been my mentor and trainer throughout my Ph.D. years. I greatly appreciate all the hours spent reading my work and providing me with constructive criticisms. Only Allah s.w.t can repay her all kindness toward me.

I also thank other members of my supervisory committee, Dr. Nazefah and Prof Nor, for their inputs and guidance throughout my research time.

I would like to thank Puan Natasha and Puan Malisa for their invaluable advice and for guiding me on the microbiology laboratory works throughout my research. I cannot express how fortunate I am being surrounded by wonderful friends during my Ph.D. years at USIM. Special thanks to my entire friend, especially Asma, Tanty, Laily, Fatin, Natasha, Malisa, Halimah, Jihan, Fairuz Fadilah, Khadijah, Nadila, Aina, Zu and others for their kindness and supports during my study.

I also thank Universiti Sains Islam Malaysia, especially Medicine and Health Science Faculty, Pandan Indah, for the technical support provided and Niche Research Grant Scheme (NRGS) for financial support. My acknowledgment also goes to the Ministry of Education of Malaysia because sponsoring me to do my Ph.D. in the USIM.

Finally, my gratefulness goes to my lovely husband, Mohamad Firdaus. You are my anchor and I will always be grateful for the support and encouragement that you have given me, I could never have done this without you. You and our children, Irdina, Hafidh and Harith are my motivation. I am also eternally grateful to my mother Puan Noormah, and my father Mad Zahir, for their prayers, emotional support financial support and teaching me to work hard to achieve my goals.

You were all a big part in helping me complete my Ph.D. and I thank you

ABSTRAK

PENGENALAN: Anemia kekurangan zat besi (IDA) adalah masalah kesihatan global. Peningkatan ketara ditunjukkan dalam parameter hematologi selepas diuji kurma dan susu kambing (GM) pada tikus IDA. Oleh itu, kajian ini akan memberi tumpuan kepada penilaian bioavailabiliti besi dalam kurma dan GM menggunakan sel Caco-2 dan kesannya terhadap parameter hematologi dan simpanan besi dalam subjek IDA. BAHAN DAN KAEDAH: Kurma Ajwa, kurma Mariami, GM dan susu kambing yang diberi makan benih Ajwa (GMFA) digunakan dan sampel disediakan menggunakan kaedah pencernaan *in vitro*. Sel caco-2 telah dituai dan digunakan untuk analisis protein dan feritin, dan lengkung standard telah diplot. Kajian kuantitatif telah dijalankan di kalangan 57 wanita dewasa yang mempunyai IDA ringan dan ditugaskan dengan rejim pemakanan yang berbeza. Sampel darah diambil dan dianalisis untuk kiraan darah penuh dan profil besi. Analisis statistik dilakukan untuk membandingkan pra dan pasca rawatan. KEPUTUSAN: Keluk piawai menunjukkan persamaan linear: Ferritin(ng)/protein(mg) = (16.519×roti Fe)+16.255, R2=0.974. Dengan menggunakan persamaan ini, bioavailabiliti besi daripada campuran kurma Mariami dan GMFA menunjukkan yang tertinggi (78.01±5.26%) berbanding sampel lain yang diuji. Ia diikuti oleh tarikh Mariami+GM (61.87±3.70%), tarikh Mariami (49.08±2.54%), tarikh Ajwa+GMFA (45.22±2.39%), tarikh Ajwa+GM (42.56±8.61%), tarikh Ajwa (26.48). ±1.32%), GMFA (9.19±0.94%) dan GM (0.87±1.14%). Peningkatan ketara dalam aktiviti hemopoietik dilaporkan selepas subjek diberi rawatan kurma dan GM berbanding kumpulan kawalan. Rawatan kurma menunjukkan peningkatan yang ketara

dalam kiraan retikulosit, hemoglobin dan isipadu sel pembungkus, manakala rawatan GM menunjukkan peningkatan ketara dalam kiraan retikulosit, sel darah merah dan hemoglobin. Subjek yang mengambil kedua-dua kurma dan GM menunjukkan peningkatan yang ketara dalam kiraan retikulosit dan hemoglobin. Tahap feritin dalam subjek telah meningkat dengan ketara selepas diberi rawatan kurma dan GM berbanding kumpulan kawalan. PERBINCANGAN: Kajian mendapati bioavailabiliti besi rawatan kurma sahaja dan rawatan GM sahaja adalah lebih rendah daripada campuran kurma dan rawatan GM. Kemasukan susu kambing dalam diet terbukti dapat meningkatkan bioavailabiliti zat besi, memperbaiki parameter hematologi dan memulihkan kandungan zat besi. GM adalah miskin dalam kandungan besi, tetapi ia mengandungi protein larut yang lebih tinggi yang menyokong penyerapan zat besi. Nampaknya, kemasukan kurma dalam diet akan kelihatan meningkatkan hemoglobin kerana ia kaya dengan zat besi dan tinggi dengan bioavailabiliti besi berbanding dengan GM. KESIMPULAN: Dapatan menyokong hipotesis bahawa kurma dan GM bermanfaat dalam IDA. Kemasukan kurma dan GM disyorkan dalam diet anemia kekurangan zat besi. Ia juga diperhatikan bahawa susu kambing tidak mengganggu penyerapan zat besi.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Iron deficiency anaemia (IDA) is a global health problem. Significant increase was shown in haematological parameters after tested date palm and goat milk (GM) on IDA rats. Therefore, this study will focus on the assessment of iron bioavailability in dates and GM using Caco-2 cell lines and their effects on haematological parameter and iron store in IDA subject. MATERIALS AND METHODS: Ajwa date, Mariami date, GM and goat milk fed Ajwa seed (GMFA) were prepared using *in vitro* digestion method. The caco-2 cells were harvested and used for analysis, and a standard curve was plotted. A quantitative study was conducted among 57 female adults who having mild IDA and assigned with different feeding regime. Blood samples was taken and analysed for full blood count and iron profile. Statistical analysis was performed to compare pre- and post-treatment. RESULTS: The standard curve showed a linear equation: Ferritin(ng)/protein(mg) = (16.519×bread Fe)+16.255, R2=0.974. Using this equation, the bioavailability of iron from the mixture of Mariami date and GMFA shows the highest (78.01±5.26%). It is followed by Mariami date+GM (61.87±3.70%), Mariami date (49.08±2.54%), Ajwa date+GMFA (45.22±2.39%), Ajwa date+GM (42.56±8.61%), Ajwa date (26.48±1.32%), GMFA (9.19±0.94%) and GM (0.87±1.14%). Significant improvement in the haemopoietic activity was reported after subjects were given with date palm and GM treatment. Date palm treatment shows a significant increment in reticulocyte count, haemoglobin and packed cell volume, while GM treatment shows a significant increment in reticulocyte count, red blood cell

and haemoglobin. Subjects who consume both date palm and GM show significant increments in reticulocyte count and haemoglobin. Furthermore, a significant improvement in ferritin levels was also observed. DISCUSSION: The study found the iron bioavailability of date palm treatment alone and GM treatment alone was lower than a mixture of date palm and GM treatment. The inclusion of goat's milk in the diet was proven to increase iron bioavailability, improve haematological parameters and restore iron content. GM is poor in iron content, but it contains a higher soluble protein which favours iron absorption. Apparently, the inclusion of dates in the diet would appear to increase haemoglobin as it is rich in iron and high in iron bioavailability as compared to GM. CONCLUSION: Findings support the hypothesis that date palm and GM is beneficial in IDA. Inclusion of date palm and GM is recommended in the diet. It was also noted that goat milk does not interfere with iron absorption.

!صخلملا

هو مشكلة صحية عالمية .لوحظ زيادة معنوية في معاملات الدم (IDA) مقدمة :فقر الدم الناجم عن نقص الحديد لذلك ، ستركز هذه الدراسة على تقييم التوافر الحيوي .IDA بعد اختبار نخيل التمر وحليب الماعز على نزران وتأثيراتها على معلمة الدم ومخزن Caco-2 للحديد في التمور والكائنات المعدلة وراثيًا باستخدام خطوط خالية المواد والطرق :تم استخدام تمر العجوة ، تمر ماريامي ، حليب الماعز المعدل وراثيا .IDA الحديد في موضوع caco-2 وتم تحضير العينة بطريقة الهضم المختبري .تم حصاد خاليا (GMFA) المغذي ببذور عجوة واستخدامها لتحليل البروتين والديترتين ، وتم رسم منحنى قياسي .أجريت دراسة كمية على 57 أنثى بالغة وتم تخصيص نظام غذائية مختلف .تم أخذ عينات الدم وتحليلها لتعداد الدم الكامل IDA مصابات بنوع معتدل من وبيانات الحديد .تم إجراء التحليل الإحصائي لمقارنة قبل وبعد العالج .النتائج :أظهر المنحنى القياسي معادلة

باستخدام .R2 = 0.974 ، خطية :تيرتين)نانوغرام / (بروتين)مجم) = (16.519 ×خبز حديد+ (16.255 أعلى نسبة)78.01 ±5.26٪(GMFA هذه المعادلة ، أظهر التوافر البيولوجي للحديد من خليط تمر ماريامي و مقارنة بالعينات الأخرى المختبرة .بينما تاريخ المريمي +المدير العام)61.87 ±3.70٪ (، تاريخ المريمي ± تمر العجوة +المدير العام)42.56 ، (45.22 ± 2.39٪) GMFA + تمر العجوة ، (49.08 ± 2.54٪) تم (9.19 ± 0.94٪) GMFA (0.87 ± 1.14٪). GMFA (تاريخ العجوة)26.48٪ ± 1.32) ، (8.61٪ الإبالغ عن تحسن معنوي في النشاط الكمون للدم بعد إعطاء الموضوع بنخيل التمر والمعالجة المعدلة وراثيا مقارنة بمجموعة التحكم .يُظهر عالج نخيل التمر زيادة كبيرة في عدد الخاليا الشبكية والهيموجلوبين وحجم الخاليا المكدسة ، بينما يُظهر العالج المعدّل وراثيًا زيادة كبيرة في عدد الخاليا الشبكية وخاليا الدم الحمراء يظهرون زيادات كبيرة في عدد الخاليا GM والهيموجلوبين .الأشخاص الذين يتناولون كل من نخيل التمر ومقارنة بمجموعة GM الشبكية والهيموجلوبين .تحسن مستوى الديترتين بشكل ملحوظ بعد معالجة نخيل التمر و التحكم .المناقشة :وجدت الدراسة أن التوافر البيولوجي للحديد في معالجة نخيل التمر وحده والمعالجة المعدلة وراثيًا وحدها كانت أقل من خليط النخيل والمعالجة المعدلة وراثيًا .ثبت أن إدراج حليب الماعز في النظام الغذائي يزيد من التوافر الحيوي للحديد ، ويحسن معايير الدم ويعيد محتوى الحديد .جزال موتورز نقير في محتوى

الحديد ، لكنه يحتوي على بروتين قابل للذوبان أعلى مما يساعد على امتصاص الحديد. على ما يبدو ، فإن إدراج الفول في النظام الغذائي يبدو أنه يزيد الهيموجلوبين ألبومين غني بالحديد ومرتفع في التوافر البيولوجي للحديد مقارنة الخالصة :تدعم النتائج الفرضية القائلة بأن فول الصويا والمعدّل وراثيًا منتجان في المؤسسة الدولية .GM مع في النظام الغذائي لفقر الدم الناجم عن نقص الحديد. كما لوحظ أن GM للمنتجة .يوصي بإدراج فول الصويا و

.حليب الماعز المتعارض مع امتصاص الحديد

CONTENT PAGE

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF APPENDICES

LIST OF ABBREVIATION AND UNIT OF MEASUREMENTS

Hb	Haemoglobin
ID	Iron deficiency
IDA	Iron deficiency anaemia
Fe	Iron
Mg	Magnesium
Zn	Zinc
Cr	Chromium
Mn	Manganese
Cu	Copper
Se	Selenium
CVDs	Cardiovascular diseases
ACE	Angiotensin-converting enzyme
Mg	Magnesium
Ca	Calcium
MCTs	Medium chain triglycerides
CLA	Conjugated linoleic acid
LAB	Lactic Acid Bacteria
MUFA	Monounsaturated fatty acids

PUFA	Polyunsaturated fatty acids
NO	Nitric oxide
DCYTB	Duodenal cytochrome B
HO-1	Heme oxygenase-1
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphates
RNR	Enzyme ribonucleotide reductase
WHO	World Health Organization
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
IRPs	Iron Regulatory Proteins
IRE	Iron-responsive Elements
TfR	Transferrin Receptor
UTR	Untranslated Region
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide
EPO	Erythropoietin
HIFs	Hypoxia Inducible Factors
KCs	Kupffer cells
RPMs	Red Pulp Macrophages