

Polska Akademia Nauk**Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt****Zakład Biologii Molekularnej****Zespół Biologii Molekularnej Żelaza****Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu,
rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**

The effect of split iron supplementation on erythrocyte and iron status, growth performance,
carcass parameters in plw and 990 line pigs

Mgr inż. Mateusz Szudzik**Autoreferat rozprawy doktorskiej**

Rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów naukowych wymienionych na str. 7 oraz omawiający je niniejszy referat

Promotor: dr hab. inż. Rafał Radosław Starzyński, prof. IGBZ PAN

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane z grantu promotorskiego KNOW/2015/CB/PRO1/45 oraz przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) grant numer 2017/25/B/NZ9/01707

Jastrzębiec, 2020

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Opiekunowi naukowemu

dr hab. Rafałowi Starzyńskiemu, prof. IGBZ

za naukę i poświęcony czas

podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej,

cenne uwagi merytoryczne i okazaną cierpliwość.

Za życzliwą i przyjacielską atmosferę

która przyczyniła się do pomyślnej realizacji mojej pracy naukowej.

Pragnę również serdecznie podziękować Panu
Prof. dr hab. Pawłowi Lipińskiemu
za cenne uwagi przekazywane w dużym spokoju,
za wszechstronną pomoc,
która była nieopisanym wsparciem
podczas czasu spędzonego z Zespołem Biologii Molekularnej Żelaza.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelni Biblioteki IGBZ PAN.

Data..... Podpis autora pracy.....

Oświadczenia autora pracy:

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data..... Podpis autora pracy.....

Spis treści

Wykaz publikacji stanowiący rozprawę doktorską	7
Streszczenie	8
Abstract	9
1. Wstęp	10
1.1 Niedokrwistość na tle niedoboru żelaza u prosiąt	10
1.2 Etiologia niedokrwistości na tle niedoboru żelaza u prosiąt	12
1.2.1 Niski poziom zapasów żelaza w wątrobie	12
1.2.3 Nierozwinięte molekularne mechanizmy absorpcji żelaza w okresie neonatalnym	15
1.3 Strategie suplementacji prosiąt żelazem	20
1.3.1 Parenteralna suplementacja żelazem	20
1.3.2 Doustne podanie suplementów żelaza	22
2. Hipotezy	25
3. Główne cele pracy	26
4. Materiał i metody	26
4.1 Zwierzęta i schemat doświadczenia	26
4.2 Pobranie prób biologicznych od zwierząt	28
4.3 Pomiar parametrów czerwonych i biochemicznych parametrów żelaza w osoczu krwi	29
4.4 Izolacja RNA z tkanek i Real-Time qPCR (RT-qPCR)	29
4.5 Pomiar poziomu hepcydyny w surowicy	30
4.6 Pomiar zawartości żelaza niehemowego w tkankach	30
4.7 Pomiar zawartości żelaza hemowego w tkankach	31
4.8 Pomiar poziomu 8-izoprostanu, transaminazy asparaginianowej (AST) i transaminazy alaninowej (ALT)	31
4.9 Barwienie tkanek błękitem Pruskim	31
4.10 Poubojowa ocena wartości rzeźnej, tucznej i wybranych parametrów jakości mięsa	32
4.11 Analiza statystyczna	33
5. Najważniejsze wyniki i dyskusja	33
6. Wnioski	46
7. Literatura	47
8. Załączniki	53
A. Publikacje stanowiące rozprawę Doktorską	53
A1. Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency Anemia	53
A2. Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters, and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs	67

A3. Innovative Oral Sucrosomial Ferric Pyrophosphate-based Supplementation Rescues Suckling Piglets From Iron Deficiency Anemia Similarly To Commonly Used Parenteral Therapy With Iron Dextran	76
B.Oświadczenia współautorów	100

Wykaz publikacji stanowiący rozprawę doktorską

1. **Mateusz Szudzik**, Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Małgorzata Lenartowicz, Paweł Lipiński. (2018). *Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia*. Pharmaceuticals (Basel). doi:10.3390/ph11040128.
2. **Mateusz Szudzik**, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). *Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs*. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w.
3. **Mateusz Szudzik**, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). *Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran*. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084.

Streszczenie

Związana z niedoborem żelaza niedokrwistość prosiąt w okresie neonatalnym jest zaburzeniem, które w zróżnicowanym natężeniu występuje powszechnie u prosiąt wszystkich ras, niezależnie od sposobu żywienia macior i systemu utrzymania prosiąt w okresie przed odsadzeniem od matek. Dlatego prosięta stanowią dogodny zwierzęcy model biomedyczny odzwierciedlający niedokrwistość na tle niedoboru żelaza we wczesnym okresie życia. Standardową procedurą weterynaryjną, która ma na celu przeciwdziałanie rozwojowi anemii u tych zwierząt jest domięśniowa iniekcja dużej dawki dekstranu żelaza. Suplementacja ta charakteryzuje się jednak toksycznością i powoduje zaburzenia w ogólnoustrojowej gospodarce żelaza poprzez wzrost produkcji hepcydyny, peptydu hamującego wchłanianie żelaza w przewodzie pokarmowym.

Wcześniejsze badania wykazały, że suplementacja prosiąt polegająca na podaniu *per os* żelaza hemowego w połączeniu z domięśniową iniekcją niskiej, nietoksycznej dawki dekstranu żelaza jest skuteczna w leczeniu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza i jednocześnie nie wywołuje objawów toksyczności żelaza w pierwszym miesiącu życia prosiąt.

W niniejszej pracy podjęto próbę oszacowania długoterminowego (do momentu uboju) efektu mieszanej suplementacji prosiąt dekstranem żelaza, podanym parenteralnie w nietoksycznej dawce, oraz hemoglobiną bydlęcą podaną *per os* na ogólnoustrojowy metabolizm żelaza, indukcję ekspresji hepcydyny i poubojową wartość rzeźną i tuczną 6-miesięcznych świń rasy wbp i linii 990. Wykazano, że u świń obu ras suplementacja mieszana była równie skuteczna w utrzymaniu fizjologicznych wartości parametrów czerwonekrwinkowych i żelaza w osoczu krwi, jak domięśniowe podania dekstranu żelaza w wysokiej, toksycznej dawce. Jednocześnie parametry rzeźne i tuczne, a także cechy jakości mięsa nie różniły się między grupami.

Kolejnym celem badań była ocena skuteczności nieinwazyjnej, doustnej suplementacji prosiąt żelazem liposomalnym w porównaniu do standardowej procedury polegającej na domięśniowej iniekcji dekstranu żelaza. Wykazano, że podawanie prosiętom preparatu żelaza liposomalnego *per os* przez okres 25 dni (od 3 do 28 dnia życia) skutecznie przeciwdziała anemii, na co wskazują fizjologiczne wartości wskaźników erytrocytarnych oraz parametrów żelaza w osoczu krwi. Ponadto prosięta suplementowane żelazem liposomalnym wykazywały znacznie niższy poziom 8-izoprostanu, biomarkera stresu oksydacyjnego, w porównaniu ze zwierzętami, którym podano dekstran żelaza. Żelazo liposomalne podane *per os* nie zwiększa znacząco poziomu hepcydyny we krwi. W świetle przedstawionych wyników, suplementy żelaza oparte o kapsułkowanie liposomalne mogą potencjalnie zostać wykorzystane do leczenia/zapobiegania niedokrwistości w odchowie prosiąt.

Abstract

Neonatal iron deficiency anemia in pigs is a common disorder in piglets of all breeds, regardless of the sow's and piglet's feed. Therefore, piglets may be considered as a convenient animal biomedical model of iron deficiency anemia. Intramuscular injection of a high dose of iron dextran to newborn piglets is a standard husbandry veterinary procedure to prevent the development of anemia. However, this supplementation may be toxic and causes imbalance in the systemic iron metabolism through increasing the production of hepcidin, a peptide that inhibits the absorption of iron in the gastrointestinal tract. Previous studies addressing split supplementation of piglets with oral heme iron in conjunction with intramuscular non-toxic dose of iron dextran showed a beneficial effect in treating iron deficiency anemia while avoiding its toxicity in the first month after birth.

The study attempted the estimation of a long-term (until the slaughter) effect of split supplementation on the systemic iron metabolism and post-mortem slaughter and fattening value of 6-month-old pigs of plw breed and 990 line. Split supplementation has been shown to be effective in maintaining physiological values of red blood cell and blood plasma iron parameters in both breeds. Slaughter and fattening parameters as well as meat quality traits did not differ between groups.

The second major aim of the present study was to evaluate the effectiveness of non-invasive piglet supplementation with liposomal iron. It has been shown that the administration of liposomal iron to the piglets for a period of 25 days (from day 3 to day 28 after birth) has effectively counteracted anemia, as indicated by physiological values of red blood cell indices and iron parameters in blood plasma. Moreover, the piglets supplemented with liposomal iron showed significantly lower levels of 8-isoprostane, a biomarker of oxidative stress, compared to the animals injected with iron dextran. Finally, liposomal iron administered *per os*, did not significantly increase hepcidin levels in the blood. It can be concluded that iron supplements based on liposomal encapsulation may be potentially used to treat/prevent iron deficiency anemia in suckling piglets.

1.Wstęp

1.1 Niedokrwistość na tle niedoboru żelaza u prosiąt

Niedobór żelaza, objawiający się w zaawansowanej postaci niedokrwistością (ang. *Iron Deficiency Anemia* – IDA), według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) uważany jest za jeden z najpoważniejszych i najczęściej występujących niedoborów żywieniowych na świecie. Problem ten może dotyczyć ludzi w każdej grupie wiekowej, najbardziej jednak narażone są dzieci w okresie niemowlęcym, a w szczególności w pierwszych tygodniach życia. Badania naukowe dowodzą, że częstość występowania anemii na tle niedoboru żelaza w tej grupie jest największa wśród wcześniaków z niską masą urodzeniową [Thompson., 2013].

Świnia (*Sus scrofa domestica*) jest jedynym gatunkiem ssaków, u którego w okresie neonatalnym, regularnie występuje anemia na tle niedoboru żelaza. Problem niedoboru żelaza u prosiąt po raz pierwszy odnotowano pod koniec XIX wieku. W 1924 r. badacze po raz pierwszy powiązali występowanie anemii u młodych prosiąt z niedoborem żelaza i wskazali go jako główny czynnik tej choroby[McGovan i Crichton, 1924]. W latach 20-tych XX wieku badania dotyczące anemii u prosiąt ukierunkowano głównie na próby leczenia tego schorzenia. W konsekwencji prosiętom zaczęto rutynowo podawać *per os* siarczan żelaza (FeSO_4). W roku 1947 Venn i in. [1947], wskazali anemię na tle niedoboru żelaza u świń jako ważny problem, zarówno naukowy jak i ekonomiczny w odniesieniu do produkcji mięsa wieprzowego.

IDA u młodych prosiąt jest zwykle niedokrwistością niedobarwliwą (hipochromiczną) i mikrocytarną, charakteryzującą się obniżeniem wartości parametrów czerwonych krwinek, takich jak liczba czerwonych krwinek (RBC), średnia objętość krwinek (MCV) i średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach (MCHC). Fizjologiczne zakresy powyższych paramet-

trów u prosiąt we wczesnym okresie pourodzeniowym (od urodzenia do odsadzenia, tj. zwykle do wieku 28 dni) powszechnie stosowane do diagnozowania IDA są trudne do oszacowania. W produkcji trzody chlewnej suplementacja prosiąt żelazem jest rutynową i obowiązkową praktyką zootechniczną stosowaną przy użyciu różnych suplementów żelaza, podawanych różnymi drogami, w różnych dawkach i według różnych harmonogramów czasowych. W piśmiennictwie naukowym przytaczane są różne wartości parametrów czerwonych krwinek nie tylko w zależności od rasy czy populacji zwierząt wybranych do danego doświadczenia, ale przede wszystkim w zależności od protokołów leczenia. Prosięta niesuplementowane żelazem szybko rozwijają anemiczny fenotyp, a zatem wartości parametrów RBC mierzone u tych zwierząt nie mogą być uważane za referencyjne. Niemniej jednak większość badaczy uznaje stężenie hemoglobiny na poziomie 8 g/dl [Egeli i in., 1998; Kegley i in., 2002] jako wartość graniczną anemii, niektórzy autorzy proponują wyższe wartości sięgające 11–13 g/dl. [Steinhardt i in., 1982]. Na podstawie danych literaturowych i doświadczeń zespołu Profesora Lipińskiego, wynika, że tak wysoki poziom hemoglobiny jest osiągalny tylko u prosiąt suplementowanych bardzo wysokimi dawkami żelaza [Lipiński i in., 2010; Staroń i in., 2015, 2017]. Bez suplementacji żelazem niedokrwistość na tle niedoboru żelaza u prosiąt pojawia się kilka dni po urodzeniu. Jednodniowe prosięta zwykle nie wykazują anemii. Stężenie hemoglobiny u noworodków sięga nieco powyżej 8 g/dl. Należy podkreślić, że większość terapii uzupełniających niedobory żelaza rozpoczyna się 2 lub 3 dnia życia prosiąt, dlatego początkowa wartość hemoglobiny jest dogodnym punktem wyjścia do testowania skuteczności nowych procedur suplementacji. W trzecim dniu życia u niesuplementowanych prosiąt stężenie hemoglobiny spada do poziomu 6-7 g / dl, a przy odsadzeniu tj. w 28 dniu życia obniża się drastycznie, nawet do 4-5 g / dl, [Lipiński i in., 2010; Staroń i in., 2015, Szabo i in., 2002], co wskazuje na stan głębokiej anemii. Ze względu na wysoką skuteczność rutynowo stosowanej suplementacji parenteralnej prosiąt, problem anemii w tej grupie zwierząt prak-

tycznie wyeliminowano, jednak w badaniach naukowych prosięta z niedokrwistością stanowią niezwykle cenny doświadczalny model zwierzęcy do analizy ogólnoustrojowych i lokalnych (w dwunastnicy) molekularnych mechanizmów regulacji metabolizmu żelaza we wczesnym okresie postnatalnym.

1.2 Etiologia niedokrwistości na tle niedoboru żelaza u prosiąt

1.2.1 Niski poziom zapasów żelaza w wątrobie.

U większości ssaków żelazo nagromadzone podczas ciąży w wątrobie płodu jest głównym źródłem tego pierwiastka, w okresie neonatalnym wykorzystywanym na potrzeby erytropoezy. Noworodki ludzkie z prawidłową masą urodzeniową posiadają zapasy żelaza wystarczające do ich rozwoju przez około pół roku po urodzeniu. Natomiast prosięta, w porównaniu z innymi ssakami, rodzą się z bardzo ograniczonymi zapasami żelaza, szacowanymi na ok. 50 mg, [Venn i in., 1947; Svoboda i in., 2005]. Jest to wartość uznawana za najniższą wśród wszystkich ssaków. Niska zawartość żelaza w wątrobie noworodków świni jest zjawiskiem, które występuje również u niemowląt o niskiej masie urodzeniowej i wcześniaków [Strauss, 2010]. Wynika to z tego, że akumulacja żelaza w wątrobie płodu odbywa się dopiero w ostatnim okresie ciąży (ostatnie 10 tygodni u świni i trzeci trymestr u człowieka) [McPherson i in., 2004; Rao i in., 2007]. Zarówno u ludzi, jak i świń, niski poziom żelaza zgromadzony w okresie płodowym wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niedokrwistości z niedoboru żelaza u noworodków. Ilość żelaza zmagazynowanego w organizmie prosiąt w czasie ciąży jest wystarczająca do pokrycia zapotrzebowania na ten mikroelement rozwijającego się noworodka tylko przez pierwsze 3-4 dni życia. Wyniki badań niezaprzeczalnie wskazują, iż u prosiąt niesuplementowanych żelazem, zawartość tego pierwiastka w wątrobie w

czwartym dniu życia spada pięciokrotnie w porównaniu z dniem narodzin, natomiast siódme-
go dnia jest wręcz niewykrywalna [Lipiński i in., 2010]. W świetle przedstawionych wyników
badań wyraźnie widać, że u nowo narodzonych prosiąt zapasy żelaza są *expressis verbis* za
niskie w stosunku do zapotrzebowania. Stała poprawa potencjału reprodukcyjnego świń (w
tym zwiększenie wielkości miotu i masy urodzeniowej) jest jednym z celów współczesnej
hodowli trzody chlewnej. Według raportu rocznego Polskiego Stowarzyszenia Hodowców i
Producentów Trzody Chlewnej „POLSUS” [2017], liczba żywych urodzonych prosiąt u
dwóch głównych matecznych polskich ras (Wielka Biała Polska, Polska Biała Zwisłoucha)
wzrosła odpowiednio o 0,5 i 0,7 sztuki między rokiem 2008, a rokiem 2017. Taki przyrost,
który jest efektem intensywnej pracy selekcyjnej, znacznie przewyższa fizjologiczny poten-
cjał loch w zakresie dostarczania płodom wystarczającej ilości żelaza. Bardzo interesujący
wydaje się fakt, że anemia w okresie neonatalnym nie występuje u dzików europejskich
(wciąż żyjących na wolności przodków udomowionych świń), mających o około połowę (4-6
sztuk) mniej prosiąt w miocie niż ich udomowiony odpowiednik [Fernández-Llario i in.,
1998]. Świnie udomowione w Eurazji około 10 000 lat temu hodowano ekstensywnie przez
tysiąclecia aż do XIX w., kiedy to wprowadzono intensywne metody hodowlane zmierzające
do doskonalenia tych zwierząt pod względem reprodukcyjnym i maksymalizacji produkcji
mięsnej [Larson i in., 2005]. W obliczu silnej presji selekcyjnej zwierzęta nie były w stanie
dostosować swoich regulacji fizjologicznych, w tym tych obejmujących dostarczenie wystar-
czającej ilości żelaza, do zapewnienia prawidłowego przebiegu podstawowych procesów bio-
logicznych odbywających się przy udziale tego biometalu. Prawdopodobnie jednym z głów-
nych procesów biologicznych charakteryzujących się niewystarczającą wydajnością u świń
jest transport żelaza przez łożysko. Jest to proces ewolucyjnie przystosowany do dostarczenia
żelaza w ilości adekwatnej dla kilku płodów, mający również na celu ograniczenie toksyczno-
ści tego pierwiastka. W tym kontekście warto zauważyć, że suplementacja żelazem ciężar-

nych loch, na różnych etapach ciąży, przy użyciu różnych suplementów podawanych doustnie lub pozajelitowo, nie ma znaczącego wpływu na poprawę statusu żelaza nowonarodzonych prosiąt, a zatem nie zapobiega wystąpieniu anemii u tych zwierząt [Cao i in., 2016; Mazgaj i in., 2020]. Pomimo prawidłowego statusu żelaza ciężarnych macior i odpowiedniej podaży tego elementu w diecie, status żelaza ich potomstwa wciąż pozostaje niski. Taki stan rzeczy zdecydowanie sugeruje, że molekularne mechanizmy odpowiedzialne za transport żelaza przez barierę łożyskową nie są wystarczająco wydajne, aby dostarczyć odpowiednią ilość żelaza do kilkunastu płodów. Wiedza na temat przemieszczania żelaza przez łożysko i regulacji tego procesu u świń jest niezadowalająca [Lipiński i in., 2013]. Zaskakujące jest to, że nawet u myszy i ludzi (u których regulacje metabolizmu żelaza poznano najlepiej spośród różnych gatunków ssaków) wiedza na temat transportu żelaza przez łożysko jest niewielka [Muckenthaler i in., 2017]. Zainteresowanie badaczy tematyką regulacji metabolizmu żelaza w łożysku wzrasta, czego dowodem jest najnowsza praca Sangkhae i in. [2019]. Autorzy cytowanej pracy wskazują receptor transferryny 1 i ferroportynę jako główne białka transportujące żelazo poprzez łożysko do płodu, a samo łożysko jako swoisty jego magazyn, z którego w warunkach niedoboru żelazo może być przekazywane do płodu. Należy podkreślić, że Autorzy cytowanej pracy dowodzą, iż znaczna część żelaza zawartego w łożysku (nawet w sytuacji niedoboru tego mikroelementu u matki) jest wykorzystywana do prawidłowego funkcjonowania tego organu.

1.2.2 Niska zawartość żelaza w mleku lochy.

Niskie stężenie żelaza w sianie i mleku lochy jest powszechnie uważane za jeden z głównych czynników ryzyka rozwoju niedokrwistości u prosiąt. Mleko świni jest bowiem niewystarczającym źródłem żelaza w porównaniu np. z mlekiem ludzkim. Stężenie żelaza w mleku lochy jest o około połowę mniejsze w porównaniu do stężenia w mleku kobiety. Stężenie tego pierwiastka w mleku lochy według różnych doniesień waha się od 1,4-do 4 mg/L

[Brady i in., 1978]. Zakładając, że codzienne spożycie mleka przez prosię wynosi 0,5-1 L, a współczynnik wchłaniania żelaza zawartego w mleku wynosi 60-90%, prosię wchłania około 1 mg żelaza dziennie, czyli ilość znacznie poniżej jego codziennego zapotrzebowania (około 7 mg) [Venn i in., 1947; Braude i in., 1962]. Próby zwiększenia stężenia żelaza w mleku loch poprzez podawanie im paszy bogatej w żelazo lub poprzez parenteralne podanie dużych ilości dekstranu żelaza podczas późnej ciąży i w czasie laktacji zakończyły się niepowodzeniem [Pond i in., 1961].

1.2.3 Nierozwinięte molekularne mechanizmy absorpcji żelaza w okresie neonatalnym

Brak w pełni funkcjonujących molekularnych mechanizmów wchłaniania żelaza w jelicie i ich regulacji u noworodków świni domowej, uznaje się za kolejny poważny czynnik w rozwoju IDA. Mechanizmy wchłaniania żelaza u dorosłych ssaków nie są jeszcze w pełni funkcjonalne we wczesnym okresie pourodzeniowym [Leong i in., 2003 a,b; Lopez i in., 2006]. U osobników dorosłych wchłanianie żelaza odbywa się głównie w odcinku proksymalnym dwunastnicy, leżącym zaraz za żołądkiem. Żelazo jest wchłaniane przez spolaryzowane komórki nabłonka jelitowego zlokalizowane w środkowej i górnej części kosmków jelitowych zwane enterocytami. Transport żelaza niehemowego przez enterocyty absorpcyjne ze światła jelita do krążenia wrotnego obejmuje dwa główne etapy:

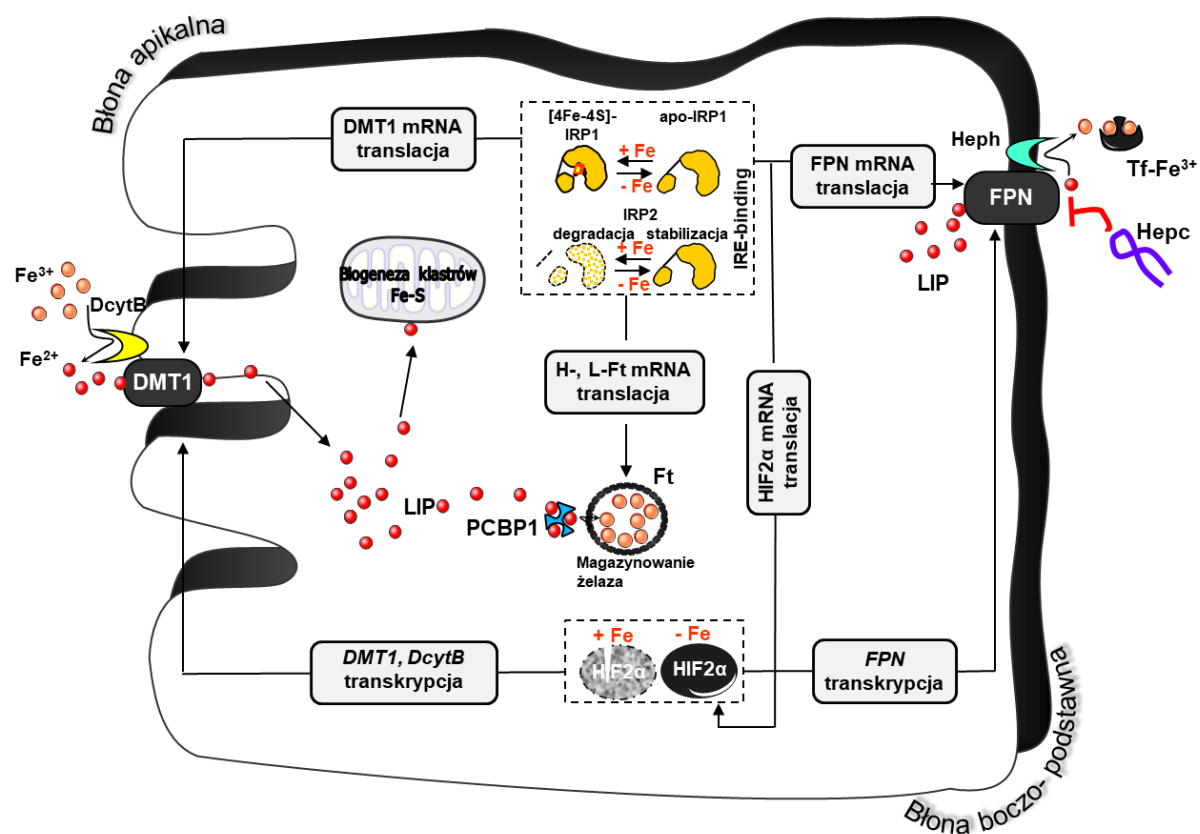
- Transport przez rąbek szczoteczkowy enterocytów za pomocą transportera metali dwuwartościowych - DMT1 (ang. *Divalent metal transporter 1*), poprzedzony enzymatyczną redukcją jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} przez ferrireduktazę - dwunastniczy cytochrom b, (DcytB) .
- eksport z enterocytu przez błonę podstawno-boczną do naczyń włosowatych jelit poprzez jedyny znany eksporter żelaza ferroportynę (Fpn).

Proces eksportu żelaza z komórki umożliwia wcześniejsze utlenienie jonów Fe^{2+} do jonów Fe^{3+} przez enzym o aktywności ferroksoydazowej - hefajstynę, która występuje wspólnie z ferroportyną w błonie podstawno-bocznej. W celu utworzenia kompleksu żelazo-transferyna, hefajstyna utlenia jony Fe^{2+} , gdyż transferryna, główne białko transportujące żelazo w krwi, wiąże jedynie jony Fe^{3+} [Gunshin i in., 2005; Vulpe, 1999]. Zarówno DcytB, jak i hefajstyna prawdopodobnie nie są niezbędne do wchłaniania żelaza zawartego w diecie. Badania na myszach ze znokautowanym genem *Cybrd1* kodującym DcytB nie wykazały upośledzonego wchłaniania żelaza, natomiast u myszy z mutacją w genie *Heph*, kodującym hefajstynę, zaobserwowano tylko niewielkie zmniejszenie wchłaniania tego mikroelementu. Wchłanianie żelaza w dwunastnicy jest przede wszystkim regulowane w zależności od statusu żelaza w organizmie przez peptyd zwany hepcydyną [Ganz i Nemeth, 2012]. Ten 25-aminokwasowy peptyd, wydzielany do osocza krwi głównie przez hepatocyty, hamuje trzy procesy: uwalnianie żelaza wchłoniętego przez enterocyty, uwalnianie żelaza z makrofagów układu siateczkowego w śledzionie i wątrobie oraz uwalnianie żelaza zawartego w hepatocytach. Aktywność biologiczna hepcydyny polega na wiązaniu się z ferroportyną, co prowadzi do przemieszczenia tego białka z błony komórkowej do wnętrza komórki, a w konsekwencji do jego degradacji [Nemeth i in., 2004, 2006]. Wzrost poziomu hepcydyny indukowany jest w odpowiedzi na wzrost zawartości żelaza w organizmie, co ma na celu ograniczenie absorpcji tego mikroelementu w dwunastnicy i w ten sposób zmniejszenie jego toksyczności [Ganz i Nemeth, 2012]. W przypadku ogólnoustrojowego niedoboru żelaza poziom hepcydyny w osoczu krwi obniża się i jest to regulacja, która ma za zadanie zwiększenie absorpcji żelaza a także zwiększenie jego uwalniania z makrofagów i hepatocytów. Na zmniejszenie ekspresji hepcydyny bezpośrednio wpływają również czynniki erytropoetyczne uwalniane przez komórki prekursorowe erytrocytów w szpiku kostnym w trakcie erytropoezy, której intensyfikacja (pobudzenie) może być skutkiem niedoboru żelaza [Papanikolaou i Pantopoulos, 2017]. Najnowsze wyniki

badania wykazały, że obok zależnej od hepcydyny regulacji ogólnoustrojowej, wchłanianie żelaza podlega również lokalnej kontroli w enterocytach. [Mastrogianaki, 2009; 2013]. Na podstawie wyników tych badań [Galy i in., 2013; Vanoaica, 2010] powrócono do koncepcji tzw. bloku śluzówkowego (ang. *Mucosal block*) jako mechanizmu regulacji wchłaniania żelaza, wysuniętej w latach 40-tych ubiegłego wieku [Granick i in., 1946]. Głównym elementem bloku śluzówkowego jest ferrytyna, białko o niespotykanym w przyrodzie wysokim potencjale magazynowania żelaza (do 4500 atomów Fe /cząsteczkę) [Harrison i Arosio, 1996]. Regulacja polega na tym, że ferrytyna „przejmuje” większość żelaza transportowanego ze światła przewodu pokarmowego. Wiązanie żelaza przez ferrytynę sprawia, że jego transport przez ferroportyne do krwi jest ograniczony. Żelazo to podlega wydaleniu z organizmu wraz z apoptotycznymi enterocytami złuszczałymi się do światła dwunastnicy. Mechanizmy molekularne, które prowadzą do retencji żelaza w enterocytach obejmują transkrypcyjną i potranskrypcyjną regulację genów zaangażowanych w absorpcję żelaza odpowiednio przez czynnik indukowany hipoksją 2 (HIF2 α , ang. *Hypoxia inducible factor*) [Mastrogianaki, 2009; 2013] i przez białka regulujące poziom żelaza komórkowego (IRP1 i IRP2 - ang. *iron regulatory protein 1 and 2*) [Galy i in., 2013].

W ciągu pierwszych dwóch tygodni po urodzeniu prosięta pobierają prawie wyłącznie pokarm płynny w postaci mleka matki. W tym okresie średnie dzienne spożycie pokarmu stałego wynosi tylko nieco powyżej 5 g. Głównym białkiem wiążącym (z wysokim powinowactwem) jony żelaza w mleku ssaków jest laktoferyna (Lf), glikoproteina z rodziny transferyn, i to właśnie to białko uznawane jest za główne źródło żelaza dla noworodków [Manzoni i in., 2018]. W dwunastnicy noworodków świni i prosiąt ssących zidentyfikowano receptor dla laktoferyny (LfR) [Liao i in., 2007], co może być dowodem, że wchłanianie żelaza we wczesnym okresie życia odbywa się na szlaku Lf-LfR. W tym kontekście niska ekspresja w dwunastnicy prosiąt głównego apikalnego transportera żelaza jonowego - DMT1 może jedynie

ograniczać wchłanianie żelaza zawartego w paszy i pochodzącego z suplementów podawanych *per os*, natomiast nie ma wpływu na wchłanianie żelaza związanego z Lf, które wykorzystuje niezależny szlak przekraczania apikalnej błony enterocytów [Lipiński i in., 2010].



Rysunek 1. Szlaki wchłanianie żelaza niehemowego przez enterocyt absorpcyjny i ich regulacja (modyfikacja na podstawie [Szudzik i in., 2018])

Wchłanianie żelaza niehemowego ma miejsce głównie w enterocytach dwunastnicy. Pierwszym etapem transportu żelaza przez błonę wierzchołkową enterocytów jest redukcja jonów żelazowych (Fe^{3+}) do jonów żelazowych (Fe^{2+}), katalizowana przez związek z błoną komórkową dwunastniczy cytochrom B (DcytB). Żelazo jest następnie transportowane do enterocytu za pomocą białka DMT1 (*ang. divalent metal transporter 1*). Po przekroczeniu błony wierzchołkowej żelazo wchodzi do tzw. labilnej puli żelaza (*ang. labile iron pool, LIP*) w cytozolu i jest następnie wykorzystywane na potrzeby komórki (np. do biogenezy kłastrów żelazowo-siarkowych w mitochondriach). W komórce żelazo jest przechowywane w ferrytynie (Ft) (która prawdopodobnie wymaga chaperonu PCBP1 (*ang. poly(rC) binding protein 1*) do transportu żelaza do Ft), lub eksportowane jest do krwioobiegu przez ferroportynę (FPN) znajdującą się na błonie podstawno-bocznej enterocytu. Eksport żelaza z enterocytów wymaga również białka zwanego hefajstyną (Heph), która jest miedzio-zależną ferroksoydazą, która utlenia jony Fe^{2+} do Fe^{3+} , bezpośrednio przed związaniem ich przez transferynę (Tf) osocza krwi. Ekspresja genów zaangażowanych w absorpcję żelaza jest regulowana wewnątrzkomórkowo na poziomie transkrypcji przez czynnik regulowany hipoksją 2 (HIF2 α) i posttranskrypcyjnie poprzez białka regulujące żelazo (IRP1 i IRP2). W warunkach niedoboru żelaza stabilizacja białka HIF2 α prowadzi do zwiększenia ekspresji genów DcytB, DMT1 i FPN na poziomie transkryptu. Natomiast w enterocytach przeładowanych żelazem, HIF2 α ulega degradacji proteosomalnej, co prowadzi do zmniejszenia jego regulatorowej aktywności transkrypcyjnej. W warunkach niskiego stężenia żelaza wewnątrzkomórkowego białka IRP wiążą się ze specyficznymi sekwencjami

reagującymi na żelazo (*iron responsive element (IREs)*) które są obecne na końcach 5'-UTR mRNA podjednostki ferrytyny (H-Ft i L-Ft) lub mRNA FPN i blokują ich translację. Z drugiej strony, bezpośrednie oddziaływania pomiędzy IRP i kilkoma motywami IRE w 3'-UTR mRNA DMT1 zwiększa okres półtrwania tych transkryptów. Odwrotna regulacja syntezy podjednostek Ft, FPN i DMT1, będąca konsekwencją braku wiązania IRPs z IRE, występuje w enterocytach o wysokim poziomie żelaza. Co ważne, obecność IRE została również zidentyfikowana w mRNA HIF2 α . Zdolność wiązania IRP1 (która w warunkach niedoboru żelaza w komórce wzrasta poprzez wzmocnioną zdolność rozpoznawania IREs przez apo-IRP1) z unikalnym IRE w 5'-UTR mRNA HIF2 α blokuje jego translację. Dynamiczne przemieszczanie się żelaza w enterocycie jest również dodatkowo kontrolowane przez ogólną-systemową regulację hormonem hepcydyną (Hepc). Białko to może wiązać się z FPN, powodując jego internalizację i degradację, a tym samym znacznie zmniejszając transport żelaza do krwi.

Należy pamiętać, że w paszy obok żelaza w formie jonowej występuje również forma hemowa tego mikroelementu. Częsteczka hemu może być transportowana przez enterocyty poprzez białka błonowe właściwe dla transportu nierozłożonego hemu. Oprócz tego ta forma żelaza w diecie jest źródłem żelaza elementarnego (po rozłożeniu cząsteczki hemu) i w postaci jonów Fe³⁺ żelazo transportowane jest immanentnym, wyżej opisanym szlakiem transportu. Zanim żelazo hemowe będzie mogło zostać wchłonięte, hem musi być odłączony z cząsteczki hemoglobiny poprzez aktywność proteolityczną enzymów w żołądku i dwunastnicy. Wchłanianie hemu w jelicie ma miejsce w początkowej części dwunastnicy. Pierwszym krokiem w absorpcji żelaza hemowego jest transport nienaruszonej cząsteczki hemu przez błonę wierzchołkową do wnętrza enterocytu za pośrednictwem białek błonowych HCP1 (*ang. Haem carrier protein 1*) i HRG1 (*ang. Heme-responsive gene 1*). Przepływ hemu przez enterocyt dzieli się następnie na dwie oddzielne ścieżki. Po pierwsze hem znajdujący się w cytoplazmie może być rozkładany za pomocą oksygenazy hemowej 1 (HO1) kodowanej przez gen *Hmox1*. W procesie tym jon żelaza zawarty w pierścieniu porfirynowym zostaje uwolniony do cytoplazmy. Wolne żelazo jest następnie wiązane przez ferrytynę, lub wprowadzane do obiegu przez ferroportynę (Fpn), gdzie wiązane jest przez transferynę (Tf). Wolny hem, oprócz tego, że jest substratem reakcji enzymatycznej katalizowanej przez HO1, może indukować ekspresję genów *Hmox1* i *Fpn* na poziomie transkrypcji poprzez motyw MARE/ARE (mechanizm, który obejmuje odpowiednio inaktywację i aktywację czynników transkrypcyjnych Bach1 i Nrf2). Ponadto żelazo uwolnione z pierścienia protoporfiryny hemu może promować transla-

cję transkryptu Fpn posiadającego w swej sekwencji motyw IRE w jego 5' UTR. Wreszcie zwiększenie ekspresji Fpn u prosiąt suplementowanych hemoglobina może być spowodowane zmniejszonym wiązaniem hepcydyny (wykazującej szczątkowe stężenie w osoczu krwi po suplementacji hemem) [Staroń i in., 2017] z ferroportyną, a tym samym jej ograniczoną degradację. Zwiększona ekspresja Fpn w enterocytach dwunastnicy prosiąt suplementowanych hemem może być kluczową przesłanką w zrozumieniu wysokiej biodostępności żelaza właśnie w tej formie. Druga ścieżka tranzytu żelaza w formie hemowej polega na transporcie nierozłożonej cząsteczki hemu, przez błonę podstawno-boczną za pomocą białka FLVCR1 (ang. *Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor 1*) do krwi, gdzie jest ona wychwytywana przez hemopeksynę (Hpx) i dostarczana w postaci kompleksu hemu z hemopeksyną poprzez receptor CD91 (ang. *Cluster of differentiation 91*) do różnych miejsc w organizmie.

1.3 Strategie suplementacji prosiąt żelazem

1.3.1 Parenteralna suplementacja żelazem

Parenteralne podanie żelaza prosiątom poprzez domięśniową iniekcję 200 mg Fe w postaci dekstranu żelaza, w ciągu 2-3 dni po urodzeniu, jest praktykowane rutynowo w hodowli świń i powszechnie uznawane przez hodowców i lekarzy weterynarii za złoty standard zapobiegania/leczenia IDA u prosiąt. W odchowie prosiąt wykorzystuje się rozmaite warianty domięśniowego podania dekstranu żelaza (różne dawki i harmonogram podania). Strategia ta od wielu lat w wyraźny sposób koryguje niedokrwistość wpływając na poprawę parametrów czerwonych krwinek u prosiąt [Svoboda i in., 2017].

Wydaje się jednak, że żelazo podane pozajelitowo w wysokiej pojedynczej lub nawet dwukrotnej dawce nie jest wydajnie metabolizowane i może zaburzyć ścisłą kontrolę ogólnoustrojowej homeostazy żelaza. Po pierwsze, nadmiar żelaza wprowadzonego do organizmu może

znacznie przekraczać jego zdolność do magazynowania i detoksykacji tego biologicznie aktywnego metalu. Po domięśniowym wstrzyknięciu dekstranu żelaza, ten wysokocząsteczkowy polimer dostaje się do makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego (RES) wątroby i śledziony przez układ limfatyczny. W makrofagach żelazo uwolnione z dekstranu jest albo przechowywane w ferrytynie, albo przekierowywane do krwioobiegu przez ferroportynę, gdzie w kompleksie z transferyną jest transportowane głównie do szpiku kostnego na potrzeby erythropoezy. W wątrobie prosiąt nastrzykiwanych dekstranem żelaza wykryto złogi tego mikroelementu w komórkach Browicza-Kupffera (makrofagi) [Lipiński i in., 2010]. Ponadto stwierdzono, że ferrytyna w wątrobie tych prosiąt jest w pełni wysycona żelazem, co wskazuje na znaczne, patologiczne przeciążenie tym pierwiastkiem [Katkiewicz i in., 1986]. Nadmiar żelaza w komórkach zwiększa ryzyko reakcji Fentona, katalizowanej przez jony Fe^{2+} , w wyniku której powstaje niezwykle reaktywny, toksyczny rodnik hydroksylowy ($OH^{\bullet}$). U prosiąt suplementowanych dekstranem żelaza odnotowuje się zwiększone poziomy różnych markerów wskazujących na stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, oraz hepatotoksyczność [Kruszewski i in., 2008; Lipiński i in., 2010]. Ponadto stosowanie iniekcji dekstranu żelaza u prosiąt wiąże się z nadmierną indukcją ekspresji hepcydyny. Jest to niekorzystne zjawisko, które wiąże się ze zmniejszeniem biodostępności żelaza w organizmie. Konsekwencją wzrostu stężenia hepcydyny we krwi jest zahamowanie wchłaniania żelaza z pokarmu w enterocytach oraz uwalniania żelaza z makrofagów. W badaniach przeprowadzonych na ludziach stwierdzono istotne zmniejszenie frakcyjnego wchłaniania żelaza, co było skutkiem wysokiego stężenia hepcydyny w grupie osobników suplementowanych żelazem [Moretti i in., 2015]. W badaniach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej przeprowadzono po raz pierwszy kompleksową analizę ekspresji hepcydyny (zmierzono mRNA hepcydyny w wątrobie, a także stężenie białka w osoczu krwi prosiąt suplementowanych i niesuplementowanych żelazem). Podanie dużych ilości żelaza prosiątom spowodowało istotny wzrost ekspresji hepcydyny,

który odnotowano zaledwie jeden dzień po wstrzyknięciu dekstranu żelaza i który utrzymywał się aż do odsadzenia prosiąt od matek (28 dzień po urodzeniu) [Starzyński i in., 2013; Staroń i in., 2015]. Natomiast u prosiąt z niedokrwistością (czyli niesuplementowanych żelazem) poziom hepcydyny był ledwo wykrywalny w osoczu krwi. Poprzednie obserwacje sugerują, że u prosiąt suplementowanych wysoką domięśniową dawką dekstranu żelaza, wchłanianie tego mikroelementu z diety może być zmniejszone [Starzyński i in., 2013]. Sytuacja taka potencjalnie może być niekorzystnym zjawiskiem, zwłaszcza od 14 dnia po urodzeniu do odsadzenia, gdy spożycie paszy stałej (zawierającej zwykle duże ilości nieorganicznego żelaza) przez prosięta jest zwiększone, a dieta staje się cennym źródłem egzogennej żelaza.

1.3.2 Doustne podanie suplementów żelaza

Do naturalnych zachowań dzików i świń należy rycie w podłożu. Zwierzęta poszukują w ten sposób pożywienia (np. bulwy i owoce roślin, bezkręgowce glebowe), pobierając przy okazji składniki gleby, która jest bogatym źródłem żelaza (20-40 g/kg) dla dziko żyjących prosiąt w ich naturalnym środowisku leśnym [Colombo i in., 2014]. Nowoczesne systemy hodowlane w zamkniętych budynkach inwentarskich uniemożliwiają rycie w ziemi, a tym samym pozbawiają świnię dostępu do tego źródła żelaza. Badania sugerują, że zwierzęta utrzymywane w systemie pastwiskowym przynajmniej częściowo uzupełniają niedobory żelaza właśnie z gleby. Doświadczenia na bardzo dużej populacji prosiąt (ponad 2300 osobników na grupę) wyraźnie wykazały jednak, że zwierzęta z chowu ekstensywnego na wolnym powietrzu nadal potrzebują pozajelitowej suplementacji dekstranem żelaza, w przeciwnym razie rozwijają niedokrwistość (poziom Hgb - 5,1 g/dL), co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej liczby upadków [Szabo i in., 2002]. Na przestrzeni lat do zapobiegania/leczenia IDA u prosiąt stosowano różne suplementy diety zawierające związki żelaza, takie jak sole żelaza, chelaty żelaza, żelazo karbonylowe, kompleks żelaza i polimaltozy oraz mikrocząstki żelaza [Antileo i in., 2016; Kegley i in., 2002; Rickner i in., 2004; Svoboda i in., 2007, 2008]. Pomimo tak du-

żej różnorodności doustnych suplementów żelaza istnieje powszechna zgoda co do tego, że suplementacja *per os* jest mniej efektywna niż parenteralna. Z drugiej jednak strony znalezienie suplementacji doustnej równie skutecznej, co pozajelitowe podanie dekstranu żelaza całkowicie wyeliminowałoby z chowu stres zwierząt związany z iniekcją domięśniową, potencjalne choroby jatrogenne i zmniejszyłoby nakład pracy. Niestety głównym czynnikiem ograniczającym skuteczność terapeutyczną tej strategii jest niskie spożycie paszy przez prosięta w ciągu pierwszych dwóch tygodni po urodzeniu. Wykazano, że bardzo wysokie (ok. 2,4g Fe/dzień /prosię) ilości żelaza w paszy [Maes i in., 2011] mogą istotnie poprawić parametry czerwonokrwinkowe. Niestety tak duże ilości żelaza w paszy powodują bardzo groźne efekty uboczne (biegunki i upośledzenie pracy wątroby), co w oczywisty sposób wpływa na ekonomikę produkcji [Zödl i in., 2004]. Żelazo może być również indywidualnie podawane prosiętom w postaci pasty bezpośrednio do jamy ustnej, lecz pracochłonność tego zabiegu oraz jego negatywny wpływ na dobrostan zwierząt eliminują tę metodę [Loh i in., 2001]. Pomimo kilku ograniczeń doustnej suplementacji prosiąt żelazem, trwają poszukiwania nowych suplementów żelaza charakteryzujących się wysoką biodostępnością oraz takich, których wchłanianie „omija” kanoniczne drogi absorpcji żelaza.

W świetle wyżej wymienionych faktów żelazo hemowe wydaje się być dobrym kandydatem na nowy, choć znany już od dawna suplement żelaza. Hem jest kompleksem protoporfiryny IX z żelazem i występuje jako grupa prostetyczna w różnych białkach (w tym hemoglobinie), które uczestniczą w ważnych procesach biologicznych. [Lin i in., 2013]. Wiele wyników badań wskazuje, że u ssaków (z wyjątkiem myszy) wchłanianie żelaza hemowego jest o wiele bardziej wydajne niż wchłanianie żelaza nieorganicznego [Anderson i in., 2005; Fillebeen i in., 2015]. W związku z tym preparaty żelaza hemowego są z powodzeniem stosowane w celu uzupełnienia niedoboru tego mikroelementu u ludzi [Gonzalez-Rosendo i in., 2010]. Żelazo hemowe jako suplement stosowano również w celu zapobiegania IDA u pro-

siąt [Quintero-Gutiérrez i in., 2008; Staroń i in., 2017; Valenzuela i in., 2016], chociaż procedura ta nie wzbudziła większego zainteresowania hodowców trzody chlewnej. Niemniej jednak niektóre badania, w tym nasze wyraźnie wykazały, że suplementacja prosiąt w oparciu o dobrowolne spożycie hemoglobiny dodanej do paszy może uchronić zwierzęta przed ciężką niedokrwistością (prosięta utrzymywały hemoglobinę na poziomie 8 g/dL przez cały okres doświadczalny, tj. od 3 do 28 dnia po urodzeniu) pomimo stosunkowo niewielkiego spożycia paszy stałej w ciągu pierwszych 10 dni po urodzeniu. Co ważne suplementacja hemoglobiną sprzyja zwalczaniu ciężkiej niedokrwistości u prosiąt, nie powodując jednocześnie niekorzystnego wzrostu ekspresji hepcydyny [Staroń i in., 2017].

Nowoczesne doustne suplementy żelaza opracowywane są głównie w oparciu o technologie enkapsulacji (kapsułkowania) liposomalnej. Polega ona na umieszczeniu leku czy suplementu (w tym przypadku żelaza w różnych formach) w strukturze składającej się z fosfolipidów [Eloy i in., 2014]. Proces enkapsulacji zwiększa biodostępność i przyswajalność suplementów żelaza, jak również zmniejsza ich toksyczność [Nemirowicz i in., 2012]. Spośród różnych technologii enkapsulacji, wykorzystanie liposomów, dwuwarstwowych pęcherzyków fosfolipidowych, cieszy się dużym zainteresowaniem w medycynie i weterynarii. Ostatnio przeprowadzono wiele badań na pacjentach i myszach z wykorzystaniem pirofosforanu żelaza wbudowanego w strukturę liposomu (Sideral®Pharmanutra, SI, Piza, Włochy) (SFP) o podwójnej błonie fosfolipidowej, powleczonego estrami sacharozy i kwasów tłuszczowych. Otoczka cukrowa ma właściwości powierzchniowo czynne, dzięki czemu cały preparat posiada większą zdolność pokonywania bariery jelitowej. Według wielu badań (SFP) dzięki zwiększonej biodostępności jest skuteczny w leczeniu niedokrwistości, co objawia się podwyższeniem poziomu hemoglobiny do fizjologicznej wartości u pacjentów i anemicznych zwierząt [Pisani i in.2015; Gomez-Ramirez i in., 2018; Giordano i in., 2015; Parisii in., 2017].

Biorąc pod uwagę zalety zarówno żelaza hemowego jak i żelaza liposomalnego w uzupełnianiu niedoboru żelaza u anemicznych osobników (ludzi i zwierząt), w niniejszej rozprawie podjęto próbę wykorzystania tych suplementów, w celu korygowania statusu żelaza prosiąt w okresie do odsadzenia od matek a także osobników dorosłych.

Zważywszy na mnogość badań, które dowodzą skuteczności tego suplementu w leczeniu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza, przeprowadzono doświadczenie wykorzystujące żelazo liposomalne w odchowie prosiąt do 28 dnia życia. Zgodnie z dostępną wiedzą wyniki badania są pierwszym dowodem udanego profilaktyczno-terapeutycznego zastosowania SFP u noworodków ssaków, jednocześnie pokazując, że dzięki specyficznej formule, żelazo zawarte w SFP może być skutecznie transportowane przez barierę jelitową i może stać się biodostępne pomimo niedojrzałości molekularnych mechanizmów wchłaniania żelaza w jelicie noworodków.

2. Hipotezy

1. Mieszana suplementacja prosiąt żelazem hemowym podawanym *per os* i niską dawką dekstranu żelaza podawanego domięśniowo:
 - a. zapewnia odpowiedni status żelaza świń na początku tuczu, co przekłada się na utrzymanie parametrów użytkowości rzeźnej tuczników.
 - b. wykazuje mniejszą toksyczność w porównaniu z tradycyjną suplementacją.
2. Występują różnice w zapotrzebowaniu na żelazo u osobników rasy wbp i linii 990, co wiąże się z różną skutecznością mieszanej suplementacji.
3. Suplementacja prosiąt żelazem liposomalnym *per os* w ciągu pierwszych 28 dni życia koryguje niedokrwistość na tle niedoboru żelaza.

3. Główne cele pracy

- Sprawdzenie dalekosiężnego efektu mieszanej suplementacji prosiąt polegającej na doustnym podaniu żelaza hemowego i domięśniowej iniekcji dekstranu żelaza w suboptymalnej dawce, w leczeniu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza.
- Porównanie efektu mieszanej suplementacji prosiąt z rutynowo stosowaną suplementacją parenteralną dekstranem żelaza na metabolizm żelaza i na wybrane cechy produkcyjne tuczników.
- Zbadanie ekspresji hepcydyny u osobników rasy wbp i linii 990 w warunkach intensywnego tuczu i u prosiąt otrzymujących żelazo liposomalne.
- Sprawdzenie przydatności żelaza liposomalnego jako doustnego suplementu korygującego noworodkową anemię prosiąt, charakteryzującego się niską toksycznością i nie wywołującego zaburzeń homeostazy żelaza.
- Ustalenie, czy żelazo liposomalne stosowane jako suplement w leczeniu niedokrwistości w odchowie prosiąt może w przyszłości wyeliminować parenteralną suplementację dekstranem żelaza.

4. Materiał i metody

4.1 Zwierzęta i schemat doświadczenia

Doświadczenia były przeprowadzane w Zakładzie Doświadczalnym Pawłowice należącym do Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach. Procedury eksperymentalne zastosowane w doświadczeniu były zgodne z wytycznymi UE (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych). Zgodnie z polskim ustawodawstwem badania na zwierzętach z wykorzystaniem dodatków paszowych i suplementów (w tym suplementów żelaza, takich jak FeSO_4 , hemoglobina, liofilizowane erytrocyty, osocze, krwi) nie są uzna-

wane za procedury badawcze i tym samym nie wpływają na dobrostan zwierząt. W związku z tym nie jest wymagana zgoda komisji etycznej.

Doświadczenie nr 1 (publikacja nr 2) przeprowadzono na 28 samcach dwóch ras: Wielka Biała Polska (wbp, N=14) i linia 990 (990, N=14). Zwierzęta pochodziły od 6 różnych ojców (3 - linia 990 i 3 - wbp) i 8 matek (4 - linia 990 i 4 - wbp). Utrzymywano je w standardowych warunkach (wilgotność 70% i temperatura 22°C). Prosięta do czasu odsadzenia (28 dzień życia) przebywały z matkami, jednocześnie nie miały dostępu do ich karmy. Prosięta otrzymywały karmę Prestarter Wigor 1 Plus od 5 do 45 dnia życia o zawartości 238 mg żelaza/kg paszy (pomiar wykonano z wykorzystaniem atomowej spektrometrii absorpcyjnej). Prosięta zostały podzielone na 4 grupy doświadczalne, po 7 sztuk w grupie na podstawie wyrównanej masy ciała przy urodzeniu: (i) prosięta wbp, (ii) prosięta 990 nastrzykiwane domięśniowo dekstranem żelaza (Ferran 100, Vet-Agro, Lublin, Polska) – kompleks dekstranu żelaza Fe^{3+} , w ilości 100 mg Fe/kg m.c. w 3 dniu życia. Jest to rutynowo stosowana suplementacja w Zakładzie Doświadczalnym Pawłowice; (iii) prosięta wbp i (iv) prosięta linii 990 nastrzykiwane domięśniowo dekstranem żelaza, w ilości 40 mg Fe/kg m.c. w 3 dniu życia i suplementowane od 5 do 45 dnia po urodzeniu hemoglobina bydlęcą (Bovogen, East Keilor, Australia), dodawaną do karmy Prestarter Wigor 1 Plus. Hemoglobina bydlęca dodana została do karmy w proporcji 38 g hemoglobiny na 1 kg paszy. Zawartość żelaza w tak przygotowanej mieszance wynosiła 612 mg Fe/kg paszy. Po 45 dniu życia zwierzęta były skarmiane typowymi paszami wykorzystywanymi w intensywnym tuczu: starter (do osiągnięcia masy 30kg o zawartości żelaza 150mg/kg paszy), grower (do osiągnięcia masy 70kg o zawartości żelaza 100mg/kg paszy) i finisher (do dnia uboju o zawartości żelaza 80mg/kg paszy).

Po osiągnięciu masy ciała 110 kg (około 180-tego dnia życia), zwierzęta zostały przetransportowane do ubojni należącej do Zakładu Doświadczalnego Pawłowice, w której dokonano uboju zgodnie z obowiązującymi standardami i przepisami.

Doświadczenie nr 2 (publikacja nr 3) przeprowadzono na 18 prosiętach rasy Wielka Biała Polska (wbp). Do doświadczenia wybrano knurki z 6 różnych miotów.

Zwierzęta utrzymywano w standardowych warunkach (wilgotność 70% i temperatura 22°C). Prosięta przez czas trwania doświadczenia przebywały z matkami, mając możliwość ssania, jednocześnie nie miały dostępu do ich karmy. Wszystkie prosięta otrzymywały karmę Prestarter Wigor 1 Plus od 5 do 28 dnia życia o zawartości 238 mg żelaza/kg paszy (pomiar j.w.). Prosięta zostały podzielone na 2 grupy doświadczalne, po 9 zwierząt w grupie na podstawie wyrównanej masy ciała przy urodzeniu: (i) Prosięta nastrzykiwane domięśniowo dekstranem żelaza (Ferran 100, Vet-Agro, Lublin, Polska) – kompleks dekstranu i żelaza Fe^{3+} , w ilości 100 mg Fe/kg m.c. w 3 dniu życia, , n=9; (ii) prosięta suplementowane *per os* od 5 do 28 dnia po urodzeniu dzienną dawką 6 mg żelaza w formie żelaza liposomalnego (Sucrosomial® iron, PharmaNutra, Pisa, Italy) (SFP), w postaci zawiesiny o objętości 2 ml preparatu mlekozatępczego (podawane prosiętom doustnie w sterylnych strzykawkach); n=9. Monitorowano średnie dzienne spożycie paszy na prosię (podobne w dwóch grupach eksperymentalnych). Zwierzęta poddano eutanazji w 28 dnia życia poprzez przedawkowanie środka znieczulającego Morbital (133.3 mg/mL of pentobarbital sodu + 26.7 mg/mL pentobarbital, Biowet, Puławy, Polska).

4.2 Pobranie prób biologicznych od zwierząt

Od każdego osobnika pobrano po około 10 ml krwi w 28 dniu życia prosiąt (w doświadczeniu 1 przyżyciowo z *vena jugularis externa*, a w doświadczeniu 2 po eutanazji z serca) i w dniu uboju (doświadczenie 1 po eutanazji z serca). Próby pobrane na heparynę o objętości 0,5 ml przekazano do analizy parametrów czerwonych krwinek. Pozostałą krew odwirowywano (2000 rpm rotor E1755, 10 min, 4°C, Mikro20, Hettich zentrifugen D-78532 Tuttlingen) w celu odebrania osocza, które porcjowano, zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz. Prosięta poddano eutanazji w 28 dniu życia poprzez wstrzyknięcie do ser-

ca śmiertelnej dawki Morbitalu (Biowet, Puławy, Polska) przez lekarza weterynarii. Następnie pobierano próbki następujących narządów: wątroby, śledziony, nerki, serca, szpiku kostnego, mięśnia pośladkowego większego, mięśnia najdłuższego grzbietu (*musculus longissimus thoracis et lumborum*, *musculus gluteus maximus*). Fragmenty tkanek utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu, płynie Bouin'a lub zamrażano i przechowywano w -80°C.

4.3 Pomiar parametrów czerwonych i biochemicznych parametrów żelaza w osoczu krwi

Parametry czerwonych: RBC (liczba czerwonych krwinek), HGB (stężenie hemoglobiny), HCT (hematokryt), MCV (średnia objętość krwinki czerwonej) oznaczono przy użyciu aparatu ADVIA 2010 (Siemens Germany). Poziom żelaza w osoczu zmierzono metodą kolorymetryczną zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (Alpha Diagnostic, Poland). Pomiar TIBC (ang. *Total Iron Binding Capacity*; całkowita zdolność transferyny do wiązania jonów żelaza) wykonywano przy użyciu zestawu firmy BioMaxima zgodnie z zaleceniami producenta. Wysycenie transferyny obliczano zgodnie ze wzorem: wysycenie Tf = stężenie Fe w osoczu \ TIBC *100.

4.4 Izolacja RNA z tkanek i Real-Time qPCR (RT-qPCR)

Całkowite RNA izolowano z wątroby (ok. 30 mg) przy użyciu odczynnika Trizol (Invitrogen) wg zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego [1987]. Dwa mikrogramy całkowitego RNA poddanego trawieniu DNazą, zgodnie z protokołem producenta (Roche, Szwajcaria) a następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu cDNA Synthesis Kit® Transcriptor First Strand. Ilościową analizę PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w Light Cycler U96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy), stosując pary starterów specyficzne dla hepcydyny. Starter prawy (5'-3') AAGACAGCTCACAGACCTCC, starter lewy (5'-3') CTACGTCTTGCAGCACATCC. Do detekcji amplifikowanych produktów użyto SYBR Green I (Roche Diagnostics). Aby potwierdzić specyficzność amplifikacji, produkty

PCR poddano analizie krzywej topnienia i elektroforezie w żelu agarozowym. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie Light Cycler U96 wersja 1.1. Poziomy transkrypcji zostały znormalizowane w stosunku do reduktazy glutationowej (GSR) starter prawy (5'-3') CACAGCTCCTCACATCCTGA, starter lewy (5'-3') GGGCAATTCTTCCAGCTGAA. Gen referencyjny został wybrany z 5 różnych genów przy użyciu oprogramowania NormFinder.

4.5 Pomiar poziomu hepcydyny w surowicy

Pomiar hepcydyny w surowicy krwi wykonano we współpracy z Profesorem Dorine Swinkels (Radboud University Nijmegen) metodą łączonej chromatografii jonowymiennej oraz spektrometrii mas Maldi-TOF (WCX-TOF MS) [Staroń., 2015]. Do próbek surowicy dodano acetonitryl i syntetyczny wzorzec ludzkiej hepcydyny-25 (Peptide International Inc.). Powstały roztwór mieszano i wirowano przy 27500 RCF przez 5 minut, po czym zebrano supernatant. Do supernatantu dodano zawiesinę kulek jonowymiennych (Macro-Prep Support Beads; Bio-Rad Laboratories) i bufor wiążący. Roztwór inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, aby umożliwić wiązanie hepcydyny z kulkami. Następnie mieszaninę przepłukano trzykrotnie i związaną hepcydynę odseparowano od kulek stosując bufor do elucji składający się z acetonitrylu i kwasu trifluorooctowego. Eluowaną frakcję z dodatkiem kwasu α -cyjano-4-hydroksycynamonowego (Bruker Daltonics) naniesiono na polerowaną stalową płytkę MSP 96 (Bruker Daltonics). Widma peptydowe wygenerowano na Microflex LT platforma desorpcji / jonizacji laserowej TOF MS (Bruker Daltonics). Stężenie świńskiej hepcydyny-25 obliczono przez porównanie wysokości pików masy z wzorcem wewnętrznym. Stężenia hepcydyny-25 w osoczu prosiąt wyrażono w nmol / l (nM). Dolna granica wykrywalności tej metody wynosiła 0,5 nM.

4.6 Pomiar zawartości żelaza niehemowego w tkankach

Zawartość żelaza niehemowego w wątrobie, śledzionie, nerkach, sercu, szpiku kostnym i mięśniach szkieletowych zmierzono po trawieniu zhomogenizowanych tkanek (około 60mg)

kwasem TCA (trichlorooctowym) w 100°C przez 10 minut. Powstały roztwór wirowano przy 10000 RPM x g przez 5 minut, po czym zebrano supernatant, a następnie dokonano kalorymetrycznego pomiaru absorbancji kompleksu żelazo-ferrozyna przy długości fali 560 nm [Torrance i Bothwell, 1980].

4.7 Pomiar zawartości żelaza hemowego w tkankach

Homogenaty wątroby, śledziony, nerek, serca i mięśni szkieletowych rozpuszczono w kwasie mrówkowym. Zawartość żelaza hemowego oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali 398 nm, stosując wzorce heminy przygotowane w kwasie mrówkowym o molowym współczynniku absorpcji $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [Motterlini i in., 1995].

4.8 Pomiar poziomu 8-izoprostanu, transaminazy asparaginianowej (AST) i transaminazy alaninowej (ALT)

Poziom 8-izoprostanu, markera stresu oksydacyjnego, ALT i AST, transaminaz będących głównymi markerami uszkodzenia wątroby, mierzono w osoczu, śledzionie i wątrobie testem ELISA zgodnie z protokołem producenta (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Hubei, Chiny).

4.9 Barwienie tkanek błękitem Pruskim

Złogi żelaza w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym analizowano za pomocą zestawu Accu-stain Iron Deposition Kit (Sigma Aldrich). Próbkę wątroby i śledziony pobrane natychmiast po uśmierceniu prosiąt utrwalono w roztworze Bouin'a przez 24 godziny, a następnie przechowywano w 70% etanolu. Po zatopieniu w parafinie próbki pocięto na skrawki o grubości 7 µm przy użyciu mikrotomu (Reichert-Jung, Niemcy). Skrawki umieszczono na szkiełku, odparafinowano i inkubowano z roztworem Perla (błękit pruski) przez 30 minut. Następnie szkiełka barwiono roztworem pararozaniliny przez 2 minuty i poddano analizie przy użyciu standardowego mikroskopu świetlnego z kamerą (Olympus, typ CH2). Tę samą procedurę barwienia błękitem pruskim przeprowadzono przy użyciu rozmazów szpiku kostnego pobranego z kości kończyny miednicznej.

4.10 Poubojowa ocena wartości rzeźnej, tucznej i wybranych parametrów jakości mięsa

Wszystkie parametry wartości rzeźnej, tucznej i parametry mięsa testowane były w Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh), zlokalizowanej w Zakładzie Doświadczalnych Instytutu Zootechniki PIB w Pawłowicach. Bezpośrednio po uboju rejestrowane były następujące cechy:

- masa ciała w dniu porodu,
- wiek w dniu uboju,
- masa ciała w dniu uboju,
- masa półtuszy,
- wydajność rzeźna,
- procentowa zawartość mięsa w tuszy (pomiar aparatem CGM Sydel)
- długość tuszy,
- średnie dzienne przyrosty (standaryzowane na 180 dzień życia)
- grubość słoniny w 5 punktach: nad łopatką, na grzbiecie oraz w 3 punktach umieszczonych na krzyżu I, II, III
- powierzchnia „oka” polędwicy,
- wysokość „oka” polędwicy
- szerokość „oka” polędwicy,

Na prawej półtuszy polędwicę przecinano wzdłuż zaznaczonej linii podziału, między ostatnim kręgiem piersiowym, a pierwszym kręgiem lędźwiowym, po czym na płaszczyźnie dogłowej (na folii lub papierze woskowym) wykonywano pełny obrys przekroju. Następnie za po-

mocą planimetru mierzono powierzchnię „oka” polędwicy. Barwę mięsa mierzono przy użyciu MINOLTA CHROMA METER CR 400. Przyrząd skalibrowano względem standardowej białej płytki (o średnicy 8 mm), system oświetlenia d / 0, źródło światła D65 i 2 °standardowy kąt obserwacji) określający składową L * koloru.

4.11 Analiza statystyczna

Wyniki analizowano statystycznie za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukey-Kramera lub testem t-studenta dla cech wykazujących rozkład normalny, natomiast dla cech, które nie przeszły weryfikacji normalności rozkładu użyto testu Manna-Whitneya. Do analizy wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, Kalifornia, USA). Weryfikację normalności rozkładu badanych cech przeprowadzono stosując test Shapiro-Wilka. Różnice między analizowanymi parametrami uznano za statystycznie istotne przy wartości $P \leq 0,05$. Dane przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ SE, (błąd standardowy). Każdy eksperyment wykonano co najmniej w dwóch powtórzeniach technicznych.

5. Najważniejsze wyniki i dyskusja

W pracy przeglądowej wchodzącej w skład niniejszej rozprawy (**Publikacja 1**), omówiono szczegółowo etiologię oraz metody zapobiegania i leczenia tej patologii. Jak sugeruje tytuł pracy przeglądowej suplementacja prosiąt jest tylko pozornie prostą terapią. Stosowane rutynowo uzupełnianie niedoboru przy pomocy parenteralnego podania dużej ilości żelaza w postaci dekstranu żelaza, jest procedurą skuteczną, szeroko akceptowaną przez hodowców i lekarzy weterynarii, nie pozbawioną jednak efektów ubocznych i wywołującą zaburzenia ogólnoustrojowej homeostazy żelaza [Starzyński i in., 2013].

Ocena skuteczności różnych strategii suplementacji prosiąt żelazem z reguły odbywa się jedynie w okresie do odsadzenia od matek w 4 tygodniu życia. Według naszej wiedzy niewiele

uwagi poświęcono dotychczas wpływowi suplementacji żelazem przed odsadzeniem na status tego mikroelementu u świń w okresie po odsadzeniu. Należy pamiętać, że w długoterminowej perspektywie uzupełnienie niedoboru żelaza i korekta niedokrwistości u prosiąt powinna zapewnić prawidłowy wzrost i rozwój zwierząt w okresie intensywnego tuczu, co jednoznacznie przekłada się na parametry rzeźne, tuczne i na jakość mięsa, a zatem na ekonomikę produkcji trzody chlewnej. W związku z powyższym podjęto próbę zastosowania suplementacji, która nie tylko gwarantowałaby utrzymanie homeostazy żelaza prosiąt odsadzanych od matek, ale również zapewniałaby dalszy prawidłowy rozwój zwierząt do osiągnięcia wieku ubojowego (**Publikacja 2**). W poprzednich badaniach naszego zespołu wykazano, że mieszana suplementacja prosiąt rasy wbp przy zastosowaniu liofilizatu hemoglobiny bydlęcej jako dodatku do paszy przez pierwsze 28 dni życia i domięśniowej iniekcji 40 mg Fe/kg m.c. (niska, nie toksyczna dawka) w postaci dekstranu żelaza jest równie skuteczna w korygowaniu anemii, co tradycyjna suplementacja przy użyciu wysokiej dawki żelaza w (100 mg Fe/kg m.c.) w postaci dekstranu żelaza ([Staroń i inn., 2017](#)). W badaniach objętych publikacją nr. 2 rozszerzamy te obserwacje o suplementację prosiąt linii 990, charakteryzujących się wyższym statusem czerwonokrwinkowym (**Publikacja 2, Tabela 1**) i w konsekwencji większym zapotrzebowaniem na żelazo. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że mieszana suplementacja spełnia podstawowy warunek zapobiegania anemii w stopniu porównywalnym do rutynowej suplementacji, o czym świadczą wartości parametrów czerwonokrwinkowych u 28-dniowych prosiąt linii 990 (**Publikacja 2, Tabela 1, Rycina 1 A,B,C**). Zarówno w przypadku 28-dniowych prosiąt rasy wbp jak i linii 990 stężenie hemoglobiny przewyższa poziom 8 g/dL, uznawany jako dolna granica normy dla zwierząt w tym wieku [[Egeli i in., 1998](#)]. Świadczy to o tym, że żelazo pochodzące z doustnie podanej prosiętom hemoglobiny, absorbowane w przewodzie pokarmowym szlakami alternatywnymi do szlaków absorpcji żelaza jonowego, opisanymi przez Staronia i in., [[2017](#)], jest biodostępne w stopniu wystarczającym dla utrzy-

mania procesu erytropoezy. W zaproponowanej przez nas suplementacji mieszanej, żelazo podane parenteralnie w formie dekstranu żelaza jest źródłem tego mikroelementu w okresie, gdy pobieranie paszy stałej przez prosięta w pierwszych dniach życia jest ograniczone. Ta ilość żelaza nie jest jednak wystarczająca do pokrycia potrzeb prosięcia. Prosięta suplementowane dawką około 40 mg Fe/kg m.c. prezentują anemiczny fenotyp w 28 dniu życia [Starczyński i in., 2013]

Warto zauważyć, że pojawienie się pierwszych objawów niedokrwistości jest zwykle poprzedzone zmniejszeniem się rezerw żelaza w wątrobie i obniżeniem stężenia żelaza w surowicy krwi. Często zdarza się, że wskaźniki czerwonych krwinek mieszczą się jeszcze w granicach normy, natomiast nagromadzone rezerwy żelaza są już znacznie uszczuplone [Panikolaou i in., 2017]. 28-dniowe prosięta rasy wbp, poddane suplementacji mieszanej wykazują, w porównaniu do zwierząt tej samej rasy suplementowanych tradycyjnie, lekki niedobór żelaza (jednak nie wywołujący niedokrwistości), co stwierdzono na podstawie obniżenia wartości parametrów biochemicznych żelaza w osoczu krwi. **(Publikacja 2, Rycina 1 A,B,C).** Wyniki takie sugerują, iż status żelaza w organizmie i wymagania co do tego pierwiastka przed odsadzeniem mogą być odmienne dla różnych ras świń. Głównym celem tej części badań było zaproponowanie takiej suplementacji, w wyniku której status czerwonych krwinek prosiąt, a także ogólnoustrojowy status żelaza, gwarantowałby dalszy prawidłowy wzrost i rozwój prosiąt aż do osiągnięcia wieku ubojowego, przy założeniu, że zwierzęta karmione są paszami o standardowej zawartości żelaza w poszczególnych fazach wzrostu i tuczu (określonych we wstępie).

Należy podkreślić fakt, że większe niedobory żelaza na początku tuczu mogą skutkować zaburzeniem procesów fizjologicznych w jego dalszych etapach. W badaniach przeprowadzonych na ludziach dowiedziono, że niedobór żelaza występujący w okresie niemowlęcym wpływa na zaburzenie rozwoju mózgu i jego funkcje w przyszłości. Oznacza to, że niedobory

żelaza w życiu neonatalnym powodują, nieadekwatny rozwój tego narządu, a odpowiednia i dostatecznie wczesna suplementacja może znieść długofalowe skutki niedoboru tego mikroelementu [Beard, 2008; Lozoff i in., 2006 a,b]. Mając na uwadze lekki niedobór żelaza zaobserwowany u 28-dniowych prosiąt rasy wbp, postanowiono przedłużyć suplementację hemoglobiną bydlęcą do 45 dnia życia prosiąt, kiedy następuje wprowadzenie paszy starter przeznaczonej dla zwierząt do osiągnięcia 30 kg masy ciała. Tym samym, jako jedne z pierwszych, nasze badania miały wykazać dalekosiężny efekt mieszanej suplementacji stosowanej przed odsadzeniem prosiąt od matek w krótkim okresie po odsadzeniu. Wyniki przedstawione w publikacji nr. 2 (**Tabela 1**) jednoznacznie dowodzą, że u około 180-dniowych zwierząt (koniec tuczu) obu ras poddanych suplementacji mieszanej we wspomnianym okresie, status czerwonokrwinkowy nie różni się od statusu zwierząt suplementowanych w/g metody tradycyjnej, czyli przy użyciu wysokiej dawki parenteralnie podanego żelaza, a wartości parametrów czerwonokrwinkowych mieszczą się w fizjologicznym zakresie [Thorn i in., 2010; Friendship i in., 1984; Perri i in., 2017; Ventrella i in., 2016]. Podobnie obraz żelaza w osoczu krwi dorosłych świń obu ras jest porównywalny niezależnie od zastosowanej suplementacji (**Publikacja 2, Rycina 1, D, E, F**). Dotyczy to również zwierząt rasy wbp, które jako 28-dniowe prosięta charakteryzowały się nieznacznym niedoborem żelaza. Brak statystycznych różnic w ekspresji mRNA hepcydyny oraz stężenia hepcydyny-25 w osoczu krwi dorosłych świń należących do różnych grup suplementacyjnych w obrębie poszczególnych ras, to dodatkowa obserwacja wskazująca na to, że regulacja ogólnoustrojowego metabolizmu żelaza przebiega podobnie bez względu na rodzaj zastosowanej suplementacji (**Publikacja 2, Rycina 2**). Korekta statusu żelaza i parametrów czerwonokrwinkowych u dorosłych zwierząt rasy wbp, może wynikać bezpośrednio z połączenia efektów dwóch czynników. Po pierwsze, dzięki mieszanej suplementacji zwierzęta w dniu odsadzenia nie cierpią z powodu niedokrwistości, co w początkowych okresach tuczu może powodować lepsze wykorzystanie paszy, jak

i szybsze oraz adekwatne do wieku przyrosty niż u zwierząt anemicznych. Po drugie, wykorzystanie wysokojakościowych pasz zawierających żelazo w okresie tuczu (rozdział Materiał i Metody) sprawia, że zwierzęta, które po odsadzeniu od matki mające rozwinięte w pełni mechanizmy absorpcji żelaza w jelitach w szybkim tempie korygują parametry czerwono-krwinkowe, jak i status żelaza do poziomu fizjologicznego.

Tak jak już wspomniano, fizjologiczne wartości wskaźników czerwono-krwinkowych nie zawsze wiążą się z prawidłową zawartością żelaza w tkankach, szczególnie tych związanych z magazynowaniem żelaza w organizmie [Muckenthaler i in., 2017]. Pomiar zawartości żelaza niehemowego w wybranych tkankach wykazał statystycznie istotnie obniżone poziomy tego mikroelementu w nerkach (rasa wbp i linia 990) oraz w śledzionie i wątrobie (linia 990) dorosłych zwierząt poddanych suplementacji mieszanej, w porównaniu do osobników suplementowanych w/g rutynowej procedury (**Publikacja 2, Rycina 3 A, B, C**). Ze względu na brak stosownych danych w piśmiennictwie, trudno jest stwierdzić, czy te niskie poziomy (w przypadku suplementacji mieszanej) mieszczą się w fizjologicznym zakresie, i czy wysokie poziomy (w przypadku suplementacji rutynowej) nie są efektem nadmiernej akumulacji żelaza. Biorąc pod uwagę wyższe wartości parametrów czerwono-krwinkowych osobników (prosiąt i tuczników) linii 990 oraz fakt, że charakteryzują się one szybszym tempem wzrostu niż osobniki rasy wbp [Michalska i in., 2004, 2006], warto zasugerować, że żelazo w organizmie tych pierwszych jest preferencyjnie przekierowywane do erytronu kosztem zmniejszenia zapasów tego mikroelementu w wątrobie i śledzionie.

Zważywszy, że mięso wieprzowe jest cennym źródłem żelaza dla konsumentów, warto zauważyć, że suplementacja mieszana nie spowodowała obniżenia zawartości żelaza hemowego i niehemowego w mięśniach szkieletowych, takich jak *Longissimus thoracis et lumborum* i *Gluteus maximus* u świń obu ras w porównaniu z powszechnie stosowaną suplementacją dużą dawką dekstranu żelaza (**Publikacja 2, Rycina 3D, E, Rycina 5**). Co istotne wiek ubojowy

tuczników (determinowany osiągnięciem ok. 110 kg masy ciała) był zbliżony we wszystkich grupach doświadczalnych (**Publikacja 2, Rycina 4A**). W porównaniu z klasyczną suplementacją, suplementacja dekstran/hemoglobina okazała się również wystarczająca w kontekście dziennych przyrostów dobowych (**Publikacja 2, Rycina 4B**) i masy ubojowej świń rasy wbp (**Publikacja 2, Rycina 4C**). Jednakże u świń linii 990 otrzymujących mieszaną suplementację średni dzienny przyrost dobowy był istotnie niższy ($P < 0,05$), co sugeruje, że suplementacja ta nie podtrzymuje w pełni szybkiego wzrostu tych zwierząt. Najwyraźniej zawartość żelaza w diecie w poszczególnych okresach tuczu jest w dużej mierze wystarczająca, aby zrekompenzować umiarkowany niedobór tego mikroelementu u odsadzanych prosiąt, (**Publikacja 2, Tabela 1, Rycina 1A, B, C**) i utrzymać zarówno prawidłowy wzrost, jak i parametry rzeźne i tuczne świń rasy wbp, ale nie zwierząt linii 990.

Co ciekawe, dodanie żelaza do karmy podawanej świniom po odsadzeniu, w ilości przekraczającej normy NRC (ang. *National Research Council*) [1998, 2012], okazało się zbędne dla poprawy wydajności wzrostu świń, cech tuszy i jakości wieprzowiny [Quintero-Gutierrez i in., 2008; Apple i in., 2006]. Jednak w przeciwieństwie do żelaza w formie jonowej (siarczan żelaza), żelazo hemowe podawane świniom od 5 tygodnia po urodzeniu sprzyjało uzyskaniu większej masy ciała zwierząt w 20 tygodniu życia. Sugeruje to większą biodostępność żelaza hemowego niż jonowego [Zhuo i in., 2018]. Wiadomo, że kolor mięsa jest istotnym czynnikiem wpływającym na jego jakość i atrakcyjność dla konsumentów [Blicharski i in., 2014]. Barwa mięsa zależy głównie od zawartości mioglobiny, która jest dominującym pigmentem w mięśniach szkieletowych [Olsson i in., 2005]. W tym kontekście warto zauważyć, że hem stosowany jako suplement zwiększa zaczerwienienie i poziom mioglobiny (która jest głównym białkiem wiążącym żelazo w mięśniach szkieletowych) mięśnia *Longissimus thoracis et lumborum* u 2-miesięcznych świń [Zhuo i in., 2018]

Według Blicharskiego i in. [2014] oraz Borzuty i in. [2016], a także, jak wykazano w niniejszym opracowaniu (**Publikacja 2, Rycina 4**) parametry rzeźne i tuczne świń rasy wbp i linii 990, poddanych tradycyjnej suplementacji dużą dawką dekstranu żelaza nie różnią się istotnie. Jednak co bardziej istotne, ww. parametry zwierząt obu ras suplementowanych zaproponowaną przez nas procedurą obejmującą małą dawkę dekstranu żelaza podanego domięśniowo i hemoglobinę podawaną *per os* nie różnią się od parametrów zwierząt suplementowanych dużą dawką dekstranu żelaza. (**Publikacja 2, Rycina 4**). Ponadto wykazaliśmy, że parametry jakości mięsa, takie jak powierzchnia "oko polędwicy" (ang. LEA-loin eye area), barwa mięsa, grubość słoniny i poziom żelaza niehemowego w mięśni *Longissimus thoracis et lumborum* u świń obu ras otrzymujących mieszaną suplementację dekstran/hemoglobina, nie różnią się statystycznie od parametrów zwierząt tradycyjnie suplementowanych dużą dawką dekstranu żelaza. Niezwykle interesująca jest natomiast 2,5-krotnie większa zawartość żelaza hemowego w mięśni *Longissimus thoracis et lumborum* u tuczników linii 990 w stosunku do wbp. Jest to kolejny wynik wskazujący na większe wymagania, co do zapotrzebowania na żelazo osobników linii 990, które uzupełnia suplementacja mieszana (**Publikacja 2, Tabela 2 i Rycina 5**).

Wolny hem jest silnym prooksydantem, katalizuje utlenianie białek, peroksydację lipidów oraz powoduje uszkodzenia DNA [Kumar i in., 2005]. Ponadto żelazo jonowe uwalniane z cząsteczek hemu wskutek jego enzymatycznej degradacji, może brać udział w reakcji Fentona, w której generowany jest toksyczny rodnik wodorotlenowy. Nadmiar wolnego hemu może więc prowadzić do uszkodzenia narządów i zaburzenia ich funkcjonowania. Suplementacja młodych prosiąt przy użyciu hemoglobiny (bogatego źródła hemu) niesie ze sobą ryzyko toksyczności. Dlatego postanowiliśmy sprawdzić u dorosłych zwierząt podstawowe markery peroksydacji lipidów oraz uszkodzenia wątroby. Stężenie w wątrobie i surowicy markerów uszkodzenia wątroby czyli, ALT (aminotransferazy alaninowej) i AST (aminotransferazy

asparginianowej) nie różnią się pomiędzy grupami suplementacyjnymi jak również pomiędzy rasami świń. Zaobserwowaliśmy jednak, spadek stężenia 8-izoprostanu w surowicy krwi u świń linii 990 suplementowanych za pomocą metody łączonej w porównaniu do standardowo suplementowanych świń. Ponadto wykazano brak różnic u rasy wbp bez względu na procedurę suplementacyjną. **(Publikacja w przygotowaniu).**

Podsumowując, przedstawione wyniki wyraźnie dowodzą, że zaproponowana przez nas mieszana suplementacja prosiąt w okresie do 45 dnia życia jest procedurą, która gwarantuje dalszy prawidłowy wzrost i rozwój zwierząt aż do uboju, satysfakcjonujące dzienne przyrosty dobowe, a także zapewnia wysoką jakość wieprzowiny. Nawet jeśli suplementacja ta nie w pełni równoważy status czerwonokrwinkowy i status żelaza prosiąt w czasie odsadzania, to te nieznaczne niedobory są uzupełniane w oparciu o pasze o standardowej zawartości żelaza zadawane zwierzętom w kolejnych etapach tuczu. Niewątpliwą zaletą mieszanej suplementacji jest brak efektów toksycznych hemowego żelaza w długoterminowym okresie.

Zakładamy, że doustna suplementacja prosiąt z wyłącznym wykorzystaniem żelaza hemowego (nawet bez niewielkiej ilości podawanego domięśniowo dekstranu żelaza) jest procedurą wartą rozważenia przez hodowców trzody chlewnej, gdyż eliminuje ona szereg niedogodności związanych z rutynową suplementacją poprzez iniekcję domięśniową dekstranu żelaza, takich jak: stres zwierząt i duża pracochłonność. Weryfikacja tej hipotezy wymagałaby przeprowadzenia doświadczeń na dużej liczbie zwierząt.

Jednym z celów przeprowadzonych badań było również znalezienie podawanego drogą *per os* suplementu żelaza, w pełni korygującego anemię prosiąt w okresie od urodzenia do odsadzenia od matek, który pozwoli całkowicie wyeliminować inwazyjną terapię w postaci domięśniowej iniekcji dekstranu żelaza. Jako suplement komercyjny spełniający te warunki zaproponowano SiderAL[®] (Sideral®Pharmanutra, SI, Piza, Włochy) (SFP), należący do grupy preparatów żelaza liposomalnego, szczegółowo opisany we wstępie. W przeprowadzonym

doświadczeniu (doświadczenie nr. 2) SFP podawano prosiętom poprzez wlew strzykawką do otworu gębowego, co nie jest procedurą bezstresową. Takie postępowanie podyktowane było jednak koniecznością ścisłej kontroli ilości podawanego po raz pierwszy prosiętom suplementu. W przyszłości należy sprawdzić skuteczność terapeutyczną SFP pobieranego przez prosięta spontanicznie z paszą. W przypadku powodzenia takiego metodycznego podejścia, suplementacja SFP spełniałaby kryterium całkowitej bezinwazyjności i obniżonej pracochłonności.

Z wyników doświadczenia nr. 2 (będącego przedmiotem publikacji 3) jednoznacznie wynika, że doustna suplementacja SFP, koryguje anemię na tle niedoboru żelaza, co stwierdzono na podstawie wartości parametrów czerwonekrwinkowych 28-dniowych prosiąt, które mieszczą się w granicach norm fizjologicznych dla zwierząt w tym wieku [Egeli i in., 1998] (**Publikacja 3, Tabela 1**). Co więcej liczba czerwonych krwinek u prosiąt, którym podano SFP była wyższa niż u prosiąt poddanych suplementacji wysoką dawką żelaza w postaci domięśniowej iniekcji dekstranu żelaza. Co istotne z zootechnicznego punktu widzenia, prosięta otrzymujące SFP charakteryzowały się prawidłowym dla tej grupy wiekowej wzrostem. Dobowe przyrost masy ciała i w konsekwencji ich masa ciała przy odsadzeniu były podobne do tych, odnotowanych u zwierząt suplementowanych wysoką dawką dekstranu żelaza (**Publikacja 3, Tabela 2**) i jednocześnie wyższe niż u prosiąt anemicznych, które nie otrzymywały żadnej suplementacji [Staroń i in., 2017]. Uzyskane wyniki dowodzą, że ilość i biodostępność żelaza dostarczanego w formie SFP jest wystarczająca do zaspokojenia potrzeb erytropoetycznych młodych prosiąt i ich prawidłowego rozwoju w ciągu pierwszych 4 tygodni życia. Wykonując badania na prosiętach do 28 dnia życia, a więc na zwierzętach których istotnym elementem diety jest mleko matki, nie należy zapominać o żelazie zawartym w mleku loch. Zmierzona zawartość żelaza w mleku była podobna (**Publikacja nr 3, Tabela 2**) i zarazem bardzo niska w porównaniu z paszą stałą oferowaną prosiętom w trakcie eksperymentu (**Publikacja 3, Ta-**

bela 1). Świadczy to o nikłym wpływie żelaza zawartego w mleku na zachowanie homeostazy żelaza u nowo narodzonych prosiąt.

Z niepublikowanych dotąd badań molekularnych aktualnie realizowanych wynika, że w przypadku zastosowania żelaza liposomalnego w postaci preparatu SiderAL® dochodzi do wzrostu poziomu ferroportyny na błonie podstawno-bocznej enterocyty z jednoczesnym wzrostem poziomu L-ferrytyny w komórkach enterocytów. Co ciekawe, nie obserwujemy przy tym podniesionego poziomu apikalnego transportera metali dwuwartościowych DMT1 (ang. divalent metal transporter 1) (**wyniki niepublikowane**). Takie wyniki badań sugerują, iż żelazo liposomalne może dostawać się do enterocyty drogami alternatywnymi np. z wykorzystaniem endocytozy, jak sugeruje Brilli i in. [2016]. Postulujemy, iż w enterocycie żelazo zostaje uwolnione z cząsteczki liposomu i dalej transportowane jest przez jedyny znany eksporter jonów żelaza czyli wspomnianą już ferroportynę.

W celu porównania stanu żelaza u prosiąt z obu grup doświadczalnych wykonano kompleksową analizę zawartości żelaza w ich tkankach, obejmującą pomiar stężenia żelaza w osoczu krwi, zawartości żelaza niehemowego oraz hemowego (**Publikacja 3, Tabela 4**) w wątrobie, śledzionie, nerkach, sercu, mózgu i w przypadku żelaza niehemowego również w szpiku kostnym. Biorąc pod uwagę, że wątroba, śledziona i szpik kostny są kluczowymi narządami dla utrzymania ogólnoustrojowej równowagi żelaza, dodatkowo przeanalizowano depozyty złogów żelaza niehemowego w tych tkankach poprzez barwienie błękitem pruskim (**Publikacja 3, Rycina 1**). Godne uwagi jest to, że prosięta suplementowane SFP wykazują wyższy poziom żelaza w osoczu krwi w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej, suplementowanej domięśniowo dużą dawką dekstranu żelaza (**Publikacja 3, Tabela 4**). Świadczy to o wysokiej przyswajalności żelaza pochodzącego z SFP i oznacza, że jest ono biodostępne w skali całego organizmu. Świadczy o tym również zawartość żelaza niehemowego w tkankach 28-dniowych prosiąt suplementowanych SFP która, nie odbiega od poziomu oznaczone-

go w tkankach zwierząt suplementowanych parenteralnie dekstranem żelaza (**Publikacja 3, Tabela 4**)

Bardzo ważnymi wspomnianymi już narządami dla metabolizmu żelaza są wątroba i śledziona. Dlatego też zmierzaliśmy zawartość tego mikroelementu występującego w formie jonowej u 28 dniowych prosiąt suplementowanych żelazem liposomalnym w tych tkankach. Tendencja do preferencyjnego gromadzenia się żelaza pochodzącego z SFP w śledzionie (**Publikacja 3, Tabela 4**), może odzwierciedlać jego udział w aktywności erytropoetycznej tego narządu. Jak wiadomo śledziona (szczególnie w okresie neonatalnym i młodzieńczym) jest jednym z narządów, w którym intensywnie przebiega proces erytropoezy [[Orphanidou-Vlachou i in., 2014](#)]. Niższa zawartość żelaza w wątrobie prosiąt suplementowanych SFP (**Publikacja 3, Tabela 4, Rycina 1**) w porównaniu ze zwierzętami z grupy suplementowanej dekstranem żelaza, może wynikać z faktu, że dekstran żelaza jest pobierany z krążenia na drodze endocytozy przez makrofagi wątroby [[Geisser i in., 1992](#)], podczas gdy żelazo pochodzące z SFP wiąże się z transferryną i transportowane jest do tkanek o wysokiej ekspresji receptora transferryny 1. Co ciekawe, suplementacja prosiąt SFP spowodowała znacznie mniejsze obciążenie szpiku kostnego żelazem niehemowym w porównaniu z prosiętami otrzymującymi dekstran żelaza (**Publikacja 3, Tabela 4**). Jednak stosując barwienie szpiku kostnego błękitem pruskim nie udało się wykryć żadnych złogów żelaza w próbkach pobranych od prosiąt suplementowanych SFP i dekstranem (**Publikacja 3, Rycina 1**). We wcześniejszych badaniach [[Lipiński i in., 2010](#); [Staroń i in., 2015](#); [Starzyński i in. 2013](#)] obserwowano również depozyty żelaza niehemowego w makrofagach wątrobowych (komórkach Browicza-Kupffera) po parenteralnym podaniu dużej ilości żelaza w postaci dekstranu żelaza. Relatywnie małe obciążenie żelazem układu siateczko-śródbłonkowego w wątrobie po suplementacji prosiąt SFP ma kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji hepcydyny peptydu hamującego wchłanianie żelaza nieorganicznego w jelicie i jego reutilizacji przez makrofagi tkankowe.

[Ganz i Nemeth, 2011; Lipiński i in., 2010; Staroń i in., 2015, 2017]. Głównym czynnikiem indukującym syntezę hepcydyny w hepatocytach w odpowiedzi na wzrost poziomu żelaza jest białko BMP6 (ang. *bone morphogenetic protein 6*) [Roth i in., 2019]. Ekspresja BMP6 indukowana jest przez żelazo w komórkach nabłonka naczyń krwionośnych wątroby i makrofagach wątroby, czyli komórkach Browicza-Kupffera [Rausa i in., 2015]. BMP6 uwolnione z tych komórek wiąże się z receptorem BMPR (ang. *bone morphogenetic protein receptor*) na hepatocytach i uruchamia wewnątrzhepatocytarny szlak transkrypcyjnej indukcji genu *Hamp*. Impulsem do zwiększonej syntezy hepcydyny jest również wysycenie żelazem transferryna, która pośrednio poprzez TfR2 wzmacnia sygnał przekazywany przez BMP6 [Muckenthaler i in., 2017]. W osoczu krwi zwierząt, którym podawano żelazo liposomalne nie stwierdzono wzrostu stężenia hepcydyny-25, które oscylowało wokół dolnej granicy wykrywalności, tj. 0,5nM (**Publikacja 3**). Otrzymane wyniki badań wskazują że, u zwierząt suplementowanych SI, zarówno wysycenie transferryny jonami żelaza sięgające 6,75% (**wynik niezamieszczony w publikacji 3**), stężenie żelaza w osoczu krwi, jak i zawartość żelaza w wątrobie (**Publikacja 3, Tabela 4**) nie przekroczyły poziomów niezbędnych do indukcji syntezy hepcydyny.

Nieoczekiwanie, stwierdzono również zaskakująco niskie stężenie hepcydyny-25 w osoczu krwi (ok. 0,5nM) 28-dniowych zwierząt suplementowanych domięśniowo dekstranem żelaza (**Publikacja 3**). Wynik ten odbiega od stężeń hepcydyny oznaczonych u zwierząt w naszych poprzednich doświadczeniach. Należy jednak podkreślić, że w analizowanym doświadczeniu zmniejszono 2-krotnie ilość żelaza podawanego zwierzętom. Poza tym w przeciwieństwie do 2-krotnej iniekcji dekstarnu żelaza 3-go i 21-go dnia życia prosiąt w poprzednich doświadczeniach, w obecnym wykonano tylko jedną iniekcję, 3 dnia po urodzeniu. [Starzyński i in., 2013; Staroń i in., 2015, 2017].

Biorąc pod uwagę potencjalną toksyczność żelaza wynikającą z udziału jonów żelazawych (Fe^{2+}) w reakcji Fentona, w wyniku której generowany jest silnie reaktywny rodnik

wodorotlenowy, każda suplementacją żelazem powinna uwzględniać ocenę toksykologiczną. Parenteralne podanie prosiętom dekstranu żelaza niesie ze sobą ryzyko nadmiernego odkładania się złogów żelaza w tkankach. Stosując tę procedurę, prosięta zazwyczaj otrzymują poprzez domięśniową iniekcję dużą ilość żelaza, która przekracza 4-5-krotnie całkowitą zawartość tego pierwiastka w ich organizmie. W konsekwencji tylko część egzogenne żelazo może być wykorzystana przez organizm prosiąt. Pozostała część staje się potencjalnie toksyczna. We wcześniejszych badaniach wykazano, że suplementacja prosiąt dekstranem żelaza powoduje uszkodzenia oksydacyjne DNA w wątrobie [Lipiński i in., 2010]. Pomimo, że w niniejszych badaniach zastosowano mniejszą suplementacyjną dawkę dekstranu żelaza, [Lipiński i in., 2010], to i tak u suplementowanych prosiąt odnotowano 2-krotnie podwyższone stężenie 8-izoprostanu, markera peroksydacji lipidów w osoczu [Tsikas i in., 2014] niż u zwierząt suplementowanych SFP (**Publikacja 3, Tabela 4**). Z uwagi na to, że izoprostan są produktami utleniania błon lipidowych w każdej tkance, nasze wyniki wskazują na znacznie mniejsze nasilenie występowania stresu oksydacyjnego u prosiąt suplementowanych żelazem liposomalnym w porównaniu ze zwierzętami poddanymi procedurze iniekcji domięśniowej dekstranem żelaza. Warto zauważyć, że całkowita ilość suplementacyjnego żelaza przeliczona na prosię w ciągu trwania całego doświadczenia jest większa w grupie „dekstranowej” niż w grupie „liposomalnej” (~200 versus 138 mg). Chociaż nie znamy dokładnej ilości żelaza zaabsorbowanego przez prosięta w przypadku suplementacji SFP, to należy zauważyć, że zawartość żelaza w odchodach prosiąt z obu grup jest niemal identyczna i zarazem bardzo niska (**Publikacja 3**). Sugeruje to, że większość żelaza liposomalnego ulega absorpcji w przewodzie pokarmowym.

Podsumowując, przedstawione w niniejszej dysertacji wyniki badań po raz pierwszy wskazują, iż żelazo poddane enkapsulacji liposomalnej, podawane doustnie prosiętom w okresie od urodzenia do odsadzenia, czyli w okresie krytycznym z punktu widzenia zapotrzebowania na

żelazo, zapobiega/koryguje występowanie niedokrwistości na tle niedoboru żelaza u tych zwierząt. Suplementacja doustna żelazem liposomalnym jest nie tylko równie skuteczna jak suplementacja pozajelitowa dekstranem żelaza, lecz dodatkowo wydaje się mniej toksyczna. Mając na uwadze, że żelazo liposomalne podawane *per os* zapobiega wystąpieniu niedokrwistości u prosiąt do 28 dnia życia, uzasadnionym wydaje się w następnej kolejności przeprowadzenie połowych doświadczeń na dużej liczbie zwierząt do 28 dnia życia, a w dalszej kolejności długoterminowego efektu działania żelaza liposomalnego w formie SiderAL® u tzn. jego wpływu na parametry rzeźne i tuczne świń jak i jakość mięsa.

Wyniki badań otrzymane na podstawie dwóch niezależnych doświadczeń na zwierzętach, w których wykorzystano nowatorskie suplementy paszy: hemoglobinę bydlęcą oraz żelazo liposomalne upoważniają do wysunięcia następujących wniosków:

6. Wnioski

1. Mieszana suplementacja prosiąt żelazem hemowym (*per os*) i niską dawką dekstranu żelaza (domięśniowo), pokrywa zapotrzebowanie prosiąt na żelazo w ciągu pierwszych 28 dni życia, a tym samym przyczynia się do utrzymania na początku intensywnego tuczu prawidłowych parametrów czerwonych krwinek, jak i ogólnoustrojowego statusu żelaza, co bezpośrednio przekłada się na odpowiedni wzrost i rozwój zwierząt w trakcie tuczu.
2. Jakość tuszy, wydajność rzeźna, parametry tuczne i jakość mięsa u świń poddanych zaproponowanej nowatorskiej mieszanej procedurze suplementacyjnej nie różnią się od w/w. parametrów u świń poddanych procedurze standardowej tj. iniekcji domięśniowej dekstranem żelaza.

3. Wyniki badań wskazują, że zwierzęta linii 990 mają większe od rasy wbp zapotrzebowanie na żelazo w okresie tuczu. Zatem, zasadnym wydaje się wprowadzenie dla tej linii zmian w zaleceniach żywieniowych dotyczących zawartości żelaza w paszy.
4. Suplementacja żelazem liposomalnym *per os* w ciągu pierwszych 28 dni życia prosiąt koryguje niedokrwistość na tle niedoboru żelaza równie skutecznie jak parenteralne podanie dużej dawki dekstranu żelaza stosowane rutynowo w odchowie prosiąt.
5. Suplementacja żelazem liposomalnym, jak również suplementacja mieszana nie wpływają na wzrost ekspresji hepcydyny-25.
6. Zaproponowane w dysertacji suplementacje z obu doświadczeń wykazują się mniejszą toksycznością w stosunku do parenteralnego podania dekstranu żelaza.

7.Literatura

- (NRC). (1998). Nutrient requirements of swine. National Research Council (10th ed.). The National Academies Press, Washington, DC.
- (NRC). (2012). Nutrient requirements of swine National Research Council. (11th ed). The National Academies Press, Washington, DC.
- Anderson G.J, Frazer D.M, McKie A.T, Vulpe C.D, Smith A. (2005).Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: Lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biometals.*, 18, 339–348.
- Antileo R, Figueroa J, Valenzuela C. (2016). Characterization of a novel encapsulated oral iron supplement to prevent iron deficiency anemia in neonatal piglets. *J. Anim. Sci.*, 94, 157-160.
- Apple J. K, Wallis-Phelps W. A, Maxwell C. V, Rakes L. K, Sawyer J. T, Hutchison S, and Fakle T. M. (2006). Effect of supplemental iron on finishing swine performance, carcass characteristics, and pork quality during retail display. *J. Anim. Sci.*, 85(3),737-45.
- Beard J.L. (2008). Why iron deficiency is important in infant development. *J. Nutr.*, 138, 2534-2536.
- Blicharski T, Ptak J, Hammermeister A, Snopkiewicz M. (2014). 2003 do 2014 – Wyniki oceny trzody chlewnej. Wyd PZHiPTCh „POLSUS”.
- Brady P.S, Ku P.K, Ullrey D.E, Miller E.R. (1978).Evaluation of an amino acid-iron chelate hematinic for the baby pig. *J. Anim. Sci.*, 47, 1135–1140.
- Braude R, Chamberlain A.G, Kotarbińska M, Mitchell, K.G. (1962).The metabolism of iron in piglets given labelled iron either orally or by injection. *Br. J. Nutr.* 16, 427–449. 31.
- Cao C, Fleming M.D. (2016).The placenta: The forgotten essential organ of iron transport. *Nutr. Rev.*, 74, 421–431.

- Chomczyński P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-9.
- Colombo C, Palumbo G, He J.-Z. Pinton R. Cesco S. (2014). Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J. Soils Sediments.*, 14, 538.
- Egeli A.K, Framstad T, Morberg H. (1998). Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets: *Act. Vet. Scand.*, 39, 381-93.
- Eloy J.O, Claro de Souza, Petrilli R, Barcellos J.P, Lee R.J, Marchetti J.M Colloids. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Surf B Biointerfaces.*, 1, 123:345-63.
- Fernández-Llario P, Mateos-Quesada P. (1998). Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriol.*, 43, 439–444.
- Fillebeen C, Gkouvatsos K, Fragoso G, Calvé A, Garcia Santos D, Buffle R.M, Becker C, Schümann K, Ponka P, Santos M.M, Pantopoulos K. (2015). Mice are poor heme absorbers and do not require intestinal Hmox1 for dietary heme iron assimilation. *Haematologica.*, 100, 334–e337.
- Friendship R.M, Lumsden J.H, McMillan I, Wilson M.R. (1984). Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. *Can. J. Rural. Med.*, 48, 390–393.
- Galy B, Ferring-Appel D, Becker C, Gretz N, Gröne H.J, Schümann K, Hentze M.W. (2013). Iron regulatory proteins control a mucosal block to intestinal iron absorption. *Cell Rep.*, 3,844–857.
- Ganz T, Nemeth E. (2011). Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.*, 62,347-360.
- Ganz T, Nemeth E. (2012). Heparin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1823, 1434–1443.
- Giordano G, Mondello P, Tambaro R, Perrotta N, D'Amico F, D'Aveta A, Berardi G, Carabellese B, Patriarca A, Corbi GM, Di Marzio L, Licianci A, Berardi D, Di Lullo L, Di Marco R. (2015). Biosimilar epoetin α is as effective as originator epoetin- α plus liposomal iron (Sideral®), vitamin B12 and folates in patients with refractory anemia: A retrospective real-life approach. *Mol Clin Oncol.*, 3(4), 781-784.
- Gonzalez-Rosendo G, Polo J, Rodriguez-Jerez J.J, Puga-Diaz R, Reyes-Navarrete E.G, Quintero-Gutierrez A.G. (2010). Bioavailability of a heme-iron concentrate product added to chocolate biscuit filling in adolescent girls living in a rural area of Mexico. *J. Food Sci.*, 75, 73-78.
- Granick S. (1946).Ferritin; increase of the protein apoferritin in the gastrointestinal mucosa as a direct response to iron feeding; the function of ferritin in the regulation of iron absorption. *J. Biol. Chem.*, 164, 737–746.
- Gunshin H, Starr C.N, Drenzo C, Fleming M.D, Jin J, Greer E.L, Sellers V.M, Galica S.M, Andrews N.C. (2005). Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood.*, 106, 2879–2883.
- Harrison P.M, Arosio P. (1996) The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1275, 161–203.
- Katkiewicz M, Malicka E, Preibisch J. (1986). Effect of iron overload on the morphology of some organs in piglets. *Pol. Arch. Vet.*, 25, 75.
- Kegley E.B, Spears J.W, Flowers W.L, Schoenherr W.D. (2002).Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig. *Nutr. Res.*, 22, 1209–1217.

- Kruszewski M, Iwaneńko T, Bartłomiejczyk T, Woliński J, Starzyński R.R, Gralak M.A, Zabielski R, Lipiński P. (2008). Hepatic iron content corresponds with the susceptibility of lymphocytes to oxidative stress in neonatal pigs. *Mutat. Res.*, 657, 146–149.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, et al. (2005). Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 307, 1618–1621.
- Leong W.I, Bowlus C.L, Tallkvist J, Lönnerdal B. (2003). DMT1 and FPN1 expression during infancy: Developmental regulation of iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 285, 1153–1161.a
- Leong W.I, Bowlus C.L, Tallkvist J, Lönnerdal B. (2003). Iron supplementation during infancy—effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. *Am. J. Clin. Nutr.*, 8, 1203–1211.b
- Liao Y, Lopez V, Shafizadeh T.B, Halsted C.H, Lönnerdal B. (2007). Cloning of a pig homologue of the human lactoferrin receptor: Expression and localization during intestinal maturation in piglets. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 148, 584–590.
- Lin Y.W, Wang J. (2013). Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review. *J. Inorg. Biochem.*, 129, 162–171.
- Lipiński P, Starzyński R.R, Canonne-Hergaux F, Tudek B, Oliński R, Kowalczyk P, et al. (2010). Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am. J. Pathol.*, 177, 1233–43.
- Lipiński P, Styś A, Starzyński R.R, (2013). Molecular Insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70(1), 23–38.
- Loh T, Leong K, Too H, Mah C, Choo P. (2001). The effects of iron supplementation in preweaning piglets. *Malays. J. Nutr.*, 7, 41–49.
- Lopez V, Suzuki Y.A, Lönnerdal B. (2006). Ontogenic changes in lactoferrin receptor and DMT1 in mouse small intestine: Implications for iron absorption during early life. *Biochem. Cell Biol.*, 84, 337–344.
- Lozoff B, Georgieff M.K. (2006). Iron deficiency and brain development. *Semin. Pediatr. Neurol.*, 2006; 13, 158–165.a
- Lozoff B, Jimenez E, Smith J.B. (2006). Double burden of iron deficiency in infancy and low socioeconomic status: a longitudinal analysis of cognitive test scores to age 19 years. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 160, 1108–1113.b
- Maes D, Steyaert M, Vanderhaeghe C, López Rodríguez A, de Jong E, et al. (2011). Comparison of oral versus parenteral iron supplementation on the health and productivity of piglets. *Vet Rec.*, 168, 188.
- Manzoni P, Dall'Agnola A, Tomé D, Kaufman D.A, Tavella E, Pieretto M, Messina A, De Luca D, Bellaiche M, Mosca A. (2018). Role of lactoferrin in neonates and infants: An update. *Am. J. Perinatol.*, 35, 561–565.
- Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon M.C, Vaulont S, Peyssonnaud C. (2009). HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.*, 119, 1159–1166.
- Mastrogiannaki M, Matak P, Peyssonnaud C. (2013). The gut in iron homeostasis: Role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood*, 122, 885–892.

- McGovan J.P, Crichton A. (1924) Iron deficiency in pigs. *Biochem. J.*, 18, 265–272.
- McPherson R.L, Ji F, Wu G, Blanton J.R, Kim S.W. (2004). Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. *J. Anim. Sci.*, 82, 2534–2540.
- Michalska G, Nowachowicz J, Bucek T, Wasilewski P.D, (2006). Wyniki oceny przyżyciowej knurków mieszańców linii 990 i rasy Pietrain różniących się tempem wzrostu. *Zeszyty Naukowe nr 248 – Zootechnika* 36, 93-98.
- Michalska G, Nowachowicz J, Chojnacki Z, Bucek T, Wasilewski P.D. (2004). Analysis of the results of performance tested young crossbred boars. *Ann. Anim. Sci.*, 2, 49-53.
- Moretti D, Goede J.S, Zeder C, Jiskra M, Chatzinakou V, Tjalsma H, Melse-Boonstra A, Brittenham G, Swinkels D.W, Zimmermann, M.B. (2015). Oral iron supplements increase hepcidin and decrease iron absorption from daily or twice-daily doses in iron-depleted young women. *Blood.*, 126, 1981–1989.
- Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM. (1995). Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am. J. Physiol.*, 269, 648-55.
- Muckenthaler M, Rivella S, Hentze M.W, Galy B. (2017). A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell.*, 168(3), 344-361.
- Mazgaj R., Szudzik M, Lipiński P, Jończy A, Smuda E, Kamyczek M, Cieślak B, Swinkels D, Lenartowicz M, and Starzyński R.R. (2020). Effect of Oral Supplementation of Healthy Pregnant Sows with Sucrosomial Ferric Pyrophosphate on Maternal Iron Status and Hepatic Iron Stores in Newborn Piglets. *Animals (Basel)*, 10, 11-13.
- Nemeth E, Tuttle M.S, Powelson J, Vaughn M.B, Donovan A, Ward D.M, Ganz T, Kaplan J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.*, 306, 2090–2093.
- Nemeth E, Ganz T. (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.*, 26, 323-42.
- Olsson V, Pickova J (2005). The influence of production systems on meat quality, with emphasis on pork. *Ambio.*, 34(4), 338–343.
- Orphanidou-Vlachou E, Tziakouri-Shiakalli C, Georgiades C.S. (2014). Extramedullary hemopoiesis. *Semin. Ultrasound CT.*, 35(3), 255-62.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. (2017). Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life.*, 69(6), 399-413.
- Parisi F, Berti C, Mandò C, Martinelli A, Mazzali C. (2017). Cetin I. Effects of different regimens of iron prophylaxis on maternal iron status and pregnancy outcome: a randomized control trial. *J Matern Fetal. Neonatal. Med.*, 30(15), 1787-1792.
- Perri A.M, O’Sullivan T.L, Harding J.C.S, Wood R.D, and Friendship R.M. (2017). Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. *Can. Vet. J.*, 4, 371–376.
- Pisani A, Riccio E, Sabbatini M, Andreucci A, Del Rio A, Visciano B, (2015). Effect of oral liposomal iron versus intravenous iron for treatment of iron deficiency anaemia in CKD patients: a randomized trial. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 30(4), 645–652.

Polish Pig Breeders and Producers Association "POLSUS". Performance Results Pigs. 2017, pp. 17–21. Available online: <https://polsus.pl/images/photos/Wydawnictwa/Wyniki%20Oceny/2017/WynikiOcenyTCh2017.pdf> (accessed on 22 November 2018).

Pond W.G, Lowrey S, Maner J.H, Loosli J.K. (1961). Parenteral iron administration to sows during gestation or lactation. *J. Anim. Sci.*, 20(4).

Quintero-Gutierrez A.G, Gonzalez-Rosendo G, Sanchez-Munoz J, Polo-Pozo J, Rodriguez-Jerez J.J. (2008). Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int. J. Biol. Sci.*, 4, 58.

Rao R, Georgieff M.K. (2007). Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 12, 54–63.

Rausa M, Pagani A, Nai A, Campanella A, Gilberti M.E, Apostoli P, Camaschella C, Silvestri L. (2015). Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron overload?. *PLoS One.*, 10(4).

Roth M.P, Meynard D, Coppin H. (2019). Regulators of hepcidin expression. *Vitam Horm.*, 110, 101–129.

Sangkhae V, Fisher A.L, Wong S, Koenig M.D, Tussing-Humphreys L, Chu A, Lelić M, Ganz T, Nemeth E. (2019). Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. *J. Clin Invest.*, 130(2), 625–640.

Staroń R, Lipiński P, Lenartowicz M, Bednarz A, Gajowiak A, Smuda E, Krzeptowski W, Pieszka M, Korolonek T, Hamza I, Swinkels D.W, Van Swelm R.P.L, Starzyński R.R. (2017). Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: Duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS One.*, 12(7).

Staroń R, Van Swelm R.P, Lipiński P, Gajowiak A, Lenartowicz M, Bednarz A, et al. (2015). Urinary Hepcidin Levels in Iron-Deficient and Iron-Supplemented Piglets Correlate with Hepcidin Hepatic mRNA and Serum Levels and with Body Iron Status. *PLoS One.*, 10.

Starzyński R.R, Laarakkers C.M, Tjalsma H, Swinkels D.W, Pieszka M, Styś A, Mickiewicz M, Lipiński P. (2013). Iron supplementation in suckling piglets: How to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *PLoS One.*, 8.

Steinhardt M, Bünger U, Furcht G, Schönfelder E. (1982). Determination of normal red blood picture values in piglets. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 36, 707–719.

Strauss R.G. (2010). Anaemia of prematurity: Pathophysiology and treatment. *Blood Rev.*, 24, 221–225.

Svoboda M, Drabek J. (2005). Iron deficiency in suckling piglets: etiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Vet.*, 49, 104–111.

Svoboda M, Ficek R, Synková B, Drábek J. (2007). Efficiency of carbonyl iron in prevention of anaemia in piglets. *Acta Vet. Brno.*, 76, 179–185.

Svoboda M, Ficek R, Drábek J. (2008). Evaluation of the efficacy of iron polymaltose complex in the prevention of anaemia in piglets. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, 52, 119–123.

Svoboda M, Vanhara J, Berlinská J. (2017). Parenteral iron administration in suckling piglets—A review. *Acta Vet. Brno.*, 86, 249–261.

- Szabo P, Bilkei G. (2002). Iron deficiency in outdoor pig production. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 49, 390–391.
- Szudzik M, Starzyński R.R, Jończy A, Mazgaj R, Lenartowicz M, and Lipiński P, (2018). Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11(4), 128.
- Thompson J, Biggs BA, Pasricha SR. (2013). Effects of daily iron supplementation in 2- to 5-year-old children: systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, 131(4), 739–53.
- Thorn C.E. (2010). “Hematology of the Pig,” In: Feldman BF, Zinkl JG and Jain NC, Eds., *Schalm’s Veterinary Hematology*, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp Chapter 109, 843–850.
- Torrance J.D, Bothwell T.H. (1980). Iron stores. *Methods. Hamatol.*, 1, 90–115.
- Tsikis D, Suchy M.T. (2016). Protocols for the measurement of the F2-isoprostane, 15(S)-8-isoprostaglandin F2 α , in biological samples by GC-MS or GC-MS/MS coupled with immunoaffinity column chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed. Life. Sci.*, 15, 191–201.
- Valenzuela C, Lagos G, Figueroa, J, Tadich T. (2016). Behavior of suckling pigs supplemented with an encapsulated iron oral formula. *J. Vet. Behav.*, 13, 6–9.
- Vanoaica L, Darshan, D, Richman, L, Schumann, K, Kühn L.C. (2010). Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metab.*, 12, 273–282.
- Venn J.A.J, McCance R.A, Widdowson E.M. (1947). Iron metabolism in piglet anemia. *J. Comp. Pathol.*, 5, 314–325.
- Ventrella D, Dondi F, Barone F, Serafini F, Elmi A, Giunti M, Romagnoli N, Forni M, and Bacci M.L. (2016). The biomedical piglet: establishing reference intervals for haematology and clinical chemistry parameters of two age groups with and without iron supplementation. *BMC Vet. Res.*, 13, 23.
- Vulpe C.D, Kuo Y.M, Murphy T.L, Cowley L, Askwith C, Libina, N, Gitschier J, Anderson G.J. (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.*, 21, 195–199.
- Zhuo Z, Yu X, Li S, Fang S, Feng J. (2018). Heme and Non-heme Iron on Growth Performances, Blood Parameters, Tissue Mineral Concentration, and Intestinal Morphology of Weanling Pigs. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 187(2), 411–417.
- Zödl B, Sargazi M, Zeiner M, Roberts N.B, Steffan I, Markt W, Ekmekcioglu C. (2004). Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell Biochem. Funct.*, 22, 143–147.

8. Załączniki

A. Publikacje stanowiące rozprawę Doktorską

A1. Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency Anemia



Review

Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency Anemia

Mateusz Szudzik ¹ , Rafał R. Starzyński ¹, Aneta Jończy ¹, Rafał Mazgaj ¹,
Małgorzata Lenartowicz ² and Paweł Lipiński ^{1,3,*}

¹ Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, 05-552 Magdalenka, Poland; m.szudzik@ighz.pl (M.S.); r.starzynski@ighz.pl (R.R.S.); a.jonczy@ighz.pl (A.J.); r.mazgaj@ighz.pl (R.M.)

² Department of Genetics and Evolution, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków, Poland; malgorzata.lenartowicz@gmail.com

³ Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland

* Correspondence: p.lipinski@ighz.pl; Tel.: +48-22-736-7046

Received: 9 October 2018; Accepted: 19 November 2018; Published: 22 November 2018



Abstract: In pigs, iron deficiency anemia (IDA) is the most prevalent deficiency disorder during the early postnatal period, frequently developing into a serious illness. On the other hand, in humans, only low-birth-weight infants, including premature infants, are especially susceptible to developing IDA. In both human and pig neonates, the initial cause of IDA is low birth iron stores. In piglets this shortage of stored iron results mainly from genetic selection over the past few decades for large litter sizes and high birth weights. As a consequence, pregnant sows cannot provide a sufficient amount of iron to the increasing number of developing fetuses. Supplementation with iron is a common practice for the treatment of IDA in piglets. For decades, the preferred procedure for delivering iron supplements during early life stages has been through the intramuscular injection of a large amount of iron dextran. However, this relatively simple therapy, which in general, efficiently corrects IDA, may generate toxic effects, and by inducing hepcidin expression, may decrease bioavailability of supplemental iron. New iron supplements are considered herein with the aim to combine the improvement of hematological status, blunting of hepcidin expression, and minimizing the toxicity of the administered iron. We propose that iron-deficient piglets constitute a convenient animal model for performing pre-clinical studies with iron supplements.

Keywords: hepcidin; iron deficiency anemia; iron dextran; neonatal period; pig; supplementation

1. Iron Deficiency Anemia (IDA) in Suckling Piglets

Iron deficiency is a very common condition, which is widespread in the human population [1]. In humans, individuals at increased risk of developing iron deficiency are young children, adolescents, and postpartum women. There is evidence in humans that iron deficiency at birth is relatively rare with the exception of low birth-weight-infants, including premature infants [2]. Pigs (*Sus scrofa domestica*) are the only mammalian species, in which neonatal iron deficiency anemia (IDA) commonly occurs, the most serious consequence of iron deficiency [3–5]. This disorder affects piglets of all breeds but its outcome is particularly severe in animals of high performance breeds. The occurrence of IDA in suckling piglets has been known for long time: The first case of anemia in piglets has been reported at the end of the 19th century [6], then in 1924 a causal link had been made between iron deficiency and the appearance of anemia [7]. Finally, 5 years later it was shown that anemia may be prevented

by the administration to piglets of iron salts (FeSO_4) [8]. The problem of neonatal IDA in piglets was first comprehensively drawn to the attention of the scientific community by Venn et al. in 1947 [3]. Thereafter, various aspects of IDA in piglets such as etiology, clinical aspects, diagnosis, prophylaxis and treatment have been the subject of several reviews [3–5,9–11].

IDA in suckling piglets is typically hypochromic, microcytic anemia characterized by a decrease in red blood cell (RBC) parameters such as mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). However, it is worth noting that physiological reference ranges for RBC indices of piglets in the early postnatal period (from birth to weaning, i.e., usually up to day 28 postpartum) commonly used to diagnose IDA are difficult to estimate. In swine production, iron supplementation of piglets is a routine and mandatory practice performed with the use of various iron supplements, administered by various routes, at differential doses of supplemental iron, and following various time schedules (reviewed in [9,10]). It is not surprising therefore that RBC parameters strongly vary in piglets depending on iron treatment protocols. On the other hand, without iron supplementation piglets rapidly develop IDA, and thus, by definition, RBC values measured in these animals (most frequently when pigs are used for research purposes) cannot be considered as normal ones. Nevertheless, there is a general consensus regarding hemoglobin concentration to set the cut-off level of anemia in suckling piglets at 8 g/dL [12,13], although some authors propose higher values reaching 11–13 g/dL [14]. It is clear from many studies [15–20] including our own [15–17] that such a level of Hgb is reachable only in piglets supplemented with very high doses of iron. Without iron supplementation IDA in piglets appears few days after birth. 1-day old piglets are usually not anemic showing Hgb concentration slightly above 8 g/dL [12,15]. It is important to underline that most iron supplementation therapies start on the 2nd or 3rd day after birth, therefore, this initial, *sensu stricto* normal Hgb value is a convenient starting point for testing the efficacy of new supplementation procedures in both veterinary practice and research. On day 3, Hgb concentration in non-supplemented piglets drops to the level of 6–7 g/dL and at weaning is drastically decreased even down to 4–5 g/dL, which indicates a state of extreme anemia [15,16,21]. Due to the efficient supplementation widely used in suckling piglets (see chapter below), anemia was practically eliminated from pig husbandry, however, in research, anemic piglets still constitute an indispensable reference group for exploring the molecular background of systemic iron metabolism in neonatal and early postnatal periods.

Etiology of IDA in Suckling Piglets

Low iron stores. In most mammals iron accumulated during pregnancy in the fetal liver is the main source of this microelement for erythropoiesis and other iron-dependent processes in the neonatal period [22]. For example, infants born full term with an appropriate weight for gestation have iron stores that are adequate for their development during about half a year after birth [22]. In contrast, piglets are born with very limited iron reserves estimated at 50 mg, which are considered the lowest among mammalian newborns [3,4]. This reduced hepatic iron reservoir in pig neonates is reminiscent of that reported in low-birth-weight and preterm infants, congruent with the fact that the birth iron stores are generated primarily during the last period of gestation (last 10 weeks in pigs [23] and third trimester in humans [22]). In both humans and pigs, low iron stores are associated with increased risk of neonatal iron deficiency anemia. Iron content in the piglet at birth covers the requirement for only the first 3–4 days of postnatal life. Indeed, in non-supplemented piglets on day 4 after birth hepatic iron content is decreased by about 5-fold compared to day 1, and on day 7 is barely detectable [15]. In this context, the question why iron stores in normally born piglets are strikingly low arises. It is conceivable to propose that the main reason is the physiological inability of pregnant sow to meet iron demand for the greater number of fetuses. Unceasing improvement of the reproductive potential (including increasing litter size), is one of the objectives of modern pig husbandry. According to the Annual Report of the Polish Pig Breeders and Producers Association “POLSUS” the number of alive born piglets in two main Polish breeds (Polish Large White and Polish Landrace), increased by 0.5 and 0.7 between 2008 and 2017, respectively [24]. Such performance, which is an effect of intensive selection for

reproductive traits, largely exceeds the physiological potential of sows to provide a sufficient amount of iron to their fetuses. Interestingly, wild boars (ancestors of domesticated pigs still present in the wild) having about half as many piglets in the litter as domestic pigs [25], seem to be not affected by neonatal IDA. Apparently, pigs domesticated from wild boars in Europe and Asia about 10,000 years ago [26] have not been able to evolve quickly enough to deal with high breeding pressure exerted only since the 19th century.

A second plausible explanation of deficient iron stores in pig fetuses and neonates is a low efficiency of iron transfer across the placenta. In this context, it is worth noting that iron supplementation of sows at various stages of pregnancy, using various iron supplements administered orally or parenterally has no significant impact on the improvement of the iron status of newborn piglets, and thus does not prevent suckling animals from becoming anemic (reviewed in [4]). The fact that despite iron abundance in pregnant sows, the iron status of their offspring still remains compromised, strongly suggests an insufficiency of the molecular machinery involved in iron transfer from mother to fetus. Obviously, this issue deserves further investigation. Our knowledge about placental iron trafficking and its regulation in pigs is poor. Surprisingly, even in mice and humans (in which iron metabolism is best studied among mammalian species) the placenta is considered the forgotten organ of iron transport, and regulatory mechanisms of iron transport from maternal to fetal circulation are only now emerging [27]. Moreover, when comparing placental iron transfer in various species, we should be aware of structural differences between human/rodent and pig placenta (hemochorial vs. epithelial type) because they may imply different regulations of iron trafficking across the placenta.

Low iron content in the sow's milk. Low iron concentration in the sow's colostrum and milk is commonly considered as risk factor in developing IDA in piglets [3–5]. Indeed, sow's milk is a very poor source of iron containing about half as much of this microelement as human milk. Iron content of sow's milk according to various reports ranges from 1.4–2.6 [28] to 0.2–4 mg/L [29]. Assuming that the daily milk intake per piglet is 0.5–1 L and that the absorption rate of milk iron is 60–90%, the piglet absorbs approximately 1 mg iron per day, an amount that is far below their daily requirement (about 7 mg) [3,30]. Importantly, attempts to increase the iron concentration in sow's milk by giving them high iron diets or by the injection of large amounts of iron dextran during late gestation and lactation have not been successful [3,31].

Immaturity of molecular iron absorption mechanisms? Immaturity of the molecular machinery involved in intestinal iron absorption and its regulation in newborn piglets have been claimed as a factor contributing to the development of IDA [15]. Although our understanding of processes of dietary iron uptake in the neonatal period of mammalian development is poor, there are strong indications from studies on rodents that mechanisms of iron absorption clearly established in adult mammals are not fully functional during early life [32–34]. In adults, iron absorption occurs mainly in the proximal part of duodenum. At the cellular level, iron is absorbed through the polarized simple columnar epithelial cells located at the mid to upper villus. The passage of non-heme iron through the absorptive enterocyte from the gut lumen into the portal circulation involves two major steps: (1) Transfer across the enterocyte brush border (apical) membrane by the iron transporter–divalent metal-ion transporter 1 (DMT1) [35], a process preceded by the enzymatic reduction of the dietary ferric iron by duodenal cytochrome *b*, (DcytB, an apical membrane ascorbate-dependent ferrireductase) [36]; (2) export from the enterocyte across the basolateral membrane into intestinal capillaries via the sole iron exporter known to date—ferroportin [37]; the trans-membrane ferroxidase, hephaestin, colocalizes with ferroportin in the basolateral membrane and oxidizes the exported ferrous iron back to ferric iron, which is then complexed to transferrin [38]. Both, DcytB and hephaestin seem not to be indispensable for dietary iron absorption at least in mice, as animals with targeted disruption of the *Cybrd1* gene coding for DcytB show normal iron phenotypes [39], and in *sla* mice carrying a mutation in the *heph* gene, the transport of iron into the circulation is only diminished [38]. The efficiency of iron absorption is normally regulated in accord with iron status of the organism by hepcidin, a 25 amino acid peptide

hormone released in to the blood plasma mainly by hepatocytes that negatively regulates the efflux of absorbed iron from enterocytes in the duodenum, the release of recycled iron from macrophages as well as the release of iron stored in hepatocytes [40]. This well-documented biological activity of hepcidin relies on its binding to ferroportin, which leads to its degradation [41]. Hepcidin is induced upon iron loading to decrease the iron level and in this way limits iron toxicity, whereas during iron deficiency there is increased erythropoietic activity and hypoxia, therefore, hepcidin expression is down-regulated to increase iron availability [40]. Recent studies demonstrated that the rate of dietary iron uptake is also locally controlled in absorptive enterocytes and that hepcidin-mediated regulation alone is insufficient to reduce iron absorption [42,43]. These studies showed the molecular mechanism of functioning of so called “mucosal block” [44], a concept of the regulation of iron absorption by duodenal ferritin, protein with an enormous capacity to store iron (up to 4500 Fe atoms/molecule [45]), which determines the level of basolateral iron efflux from the duodenal epithelium. Local control of duodenal iron absorption also involves transcriptional and post-transcriptional regulation of genes involved in iron absorption by hypoxia inducible factor 2 [46] and iron regulatory protein 1 [43], respectively. Recent advances in the understanding of this gut regulation have been detailed elsewhere [47]. In Figure 1, we provide an outline of duodenal non-heme iron absorption and its regulation.

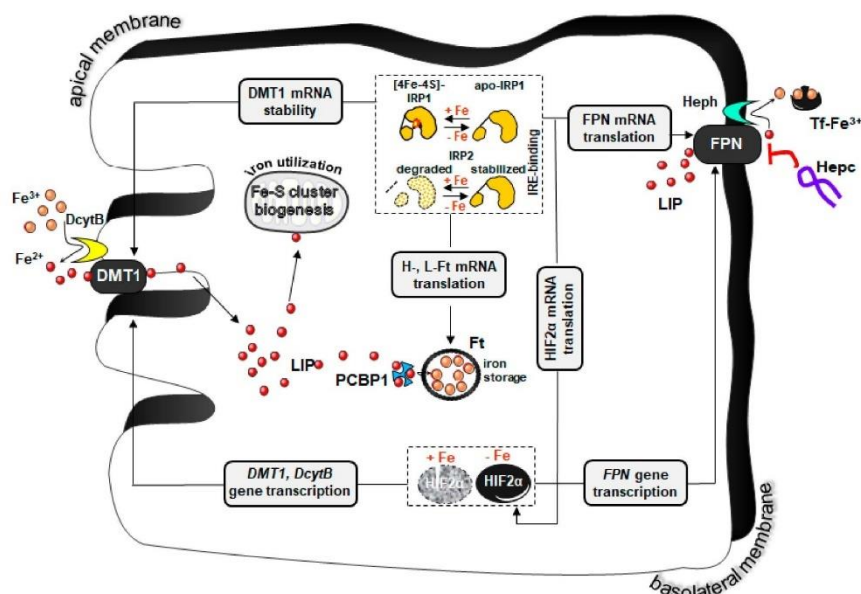


Figure 1. Intestinal uptake of non-heme iron and its regulation. Non-heme iron absorption occurs mainly in duodenal enterocytes. The first step in the transport of iron across the apical membrane of enterocytes is ferric (Fe^{3+}) to ferrous (Fe^{2+}) iron reduction, catalyzed by the membrane-associated ferrireductase duodenal cytochrome B (DcytB). Ferrous iron is subsequently transported into the enterocyte via the divalent metal transporter 1 (DMT1)-dependent pathway. After crossing the apical membrane, iron enters so called labile iron pool (LIP) in the cytosol and is subsequently used for cellular needs (e.g., for iron–sulfur cluster biogenesis in mitochondria), stored inside the cell in ferritin (Ft), which probably requires the chaperone PCBP1 (poly (rC) binding protein 1) to delivers iron to Ft), or exported into the circulation by the iron exporter ferroportin (FPN) present on the basolateral membrane. Iron export from enterocytes also requires hephaestin (Heph), a multi-copper oxidase, which oxidizes Fe^{2+} to Fe^{3+} , prior to iron binding by transferrin (Tf) in the blood. The expression of genes involved in iron absorption is regulated intracellularly at the level of transcription by hypoxia

inducible factor 2 alpha (HIF2 α) and post-transcriptionally via iron regulatory proteins (IRP1 and IRP2). Under iron-deficient conditions, stabilization of HIF2 α protein leads to the transcriptional up-regulation of *DcytB*, *Dmt1* and *Fpn* genes. In contrast, in iron replete enterocytes HIF2 α undergoes accelerated proteosomal degradation resulting in the decrease of its transcriptional activity. At low intracellular iron concentrations, IRPs bind to specific iron regulatory elements (IREs) present in the 5'-UTR mRNAs encoding ferritin subunits (H- and L-Ft) or FPN mRNAs and block their translation. On the other hand, direct interactions between IRPs and several IRE motifs in the 3'-UTR DMT1 mRNA stabilize this transcript. The converse regulation of Ft subunits, FPN and DMT1 synthesis, being a consequence of the lack of binding of IRPs to IRE, occurs in enterocytes with high iron level. Importantly, the presence of IRE has also been identified in HIF2 α mRNA. Binding of IRP1 (which under iron deficient conditions gains the ability to recognize IREs with high affinity) to the unique IRE in the 5'-UTR of HIF2 α mRNA blocks its translation. Iron trafficking across the enterocyte is also controlled extracellularly by the systemic iron regulatory hormone hepcidin (Hepc). Hepcidin can bind to FPN, causing its internalization and degradation, hence decreasing iron export from enterocytes into the blood plasma.

It seems that in neonatal piglets fed almost an exclusive milk diet (mean daily intake of solid feed by piglets during two first weeks after birth is only slightly above 3 g [17]) and in infants with exclusive breast feeding, this complex molecular machinery described above is not mandatory for iron absorption. Lactoferrin, a major iron-binding glycoprotein abundantly present in milk, retaining bound iron down to a pH of ~3.5 [48], was postulated to be involved in intestinal iron absorption in suckling newborn animals and breast-fed infants. The identification of a specific receptor for lactoferrin (LfR) in the duodenum of newborn infants [49] and suckling piglets [50] is evidence that the Lf-LfR pathway is involved in iron absorption during early life. In this context, low duodenal expression of the two major iron transporters DMT1 and Fpn reported in pig neonates [15] may only impair absorption of iron contained in the solid diet and/or derived from dietary iron supplements and not Lf-bound iron, which uses an independent pathway to cross intestinal barrier.

High iron requirements in suckling piglets. Iron supply from natural sources such as hepatic iron stores and iron contained in the sow's milk cannot balance the extremely high iron demand in suckling piglets. According to various authors their daily iron requirements are estimated at the level between 7 and 16 mg [20,30], which largely exceeds the amount of iron provided from natural sources. It is worth noting that upper reference values have been established for piglets with daily body weight gain of 250 g and more [20]. Indeed, high growth intensity of piglets in early postnatal life is a crucial factor determining this huge iron need. Piglets increase their body mass 2-, 4- and 10-fold within first week, 3 and 6 weeks after birth, respectively being the most rapidly growing animals among livestock species [5]. This impressive growth rate is accompanied by the expansion of blood volume, high erythropoietic activity resulting in an increased number of red blood cells that require an enormous amount of iron to maintain adequate hemoglobin level. Of note, a major part (~70%) of body iron is present associated with hemoglobin of developing erythroblasts in bone marrow and mature circulating erythrocytes.

2. Iron Supplementation of Piglets

2.1. Intramuscular Supplementation with Iron Dextran (FeDex)—A Gold Standard?

To counteract the development of anemia in young pigs, an exogenous iron source must be administered. Parenteral iron supplementation of piglets by intramuscular injection of 200 mg Fe in the form of FeDex (high molecular weight iron complex composed of a polynuclear iron hydroxide with dextran (polyisomaltose)) within 2–3 days after birth is routinely practiced in pig breeding and commonly considered by breeders and veterinary surgeons a golden standard for the prevention/treatment of IDA in suckling piglets [9]. Multiple variants of this method (in terms of number of injections, their time schedules and the amount of injected FeDex) have been proved

to be generally beneficial in correcting iron deficiency in newborn piglets [15,18,20,51]. However, it seems that high parenteral intake of supplemental iron given in a single dose or even twice is not efficiently metabolized and may perturb the tight control of systemic iron homeostasis. First, excess of iron introduced to the organism may strongly exceed its capacity to store and detoxify this biologically active metal with ferritin. It is worth noting that after intramuscular injection of FeDex, this complex enters macrophages of the reticuloendothelial system (RES) via lymphatic circulation [52]. In macrophages, iron released from FeDex is either stored in ferritin [53] or redirected from these cells into the circulation by ferroportin where it is bound to transferrin and transported mainly to the erythropoietic compartment. In piglets supplemented with large amounts of FeDex, iron has been detected in Browicz-Kupffer cells (hepatic macrophages) by Prussian blue staining in the form of massive iron deposits [15]. Moreover, ferritin in the liver of these piglets has been found to be fully saturated with iron pointing to heavy pathological iron overload [15]. When in excess, iron is toxic because it generates through the Fenton reaction, the hydroxyl radical that reacts nonspecifically with biological molecules. Accordingly, piglets excessively loaded with FeDex showed increased hepatic levels of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), an oxidatively modified nucleoside in DNA, a biomarker of iron-induced oxidative stress [15,54]. These piglets showed also elevated levels of 8-isoprostane, a biomarker providing a reliable measure of oxidative stress in whole organism [55]. It is not surprising therefore that an acute toxicity of the overdose of FeDex has been reported in antioxidant-deficient piglets [56]. Sporadically, toxicity of FeDex given to piglets may be also assigned to dextran (sugar part of FeDex)-induced anaphylactic reactions [57].

Second, applying FeDex therapy to piglets also implies the necessity for caution due to the possibility of excessive induction of hepcidin expression by supplemental iron, and in consequence, inhibition of iron absorption from the diet as well as iron release from macrophages (utilization of iron freed from FeDex). In humans, the incidence of such risk has been clearly demonstrated in iron-supplemented women showing significantly decreased fractional iron absorption, which was associated with acute increase in hepcidin [58]. In our studies, we have performed for the first time a comprehensive analysis of hepcidin expression (we measured the abundance of hepcidin mRNA in the liver as well as hepcidin concentration in blood plasma and urine) in suckling piglets supplemented with FeDex and in anemic, non-supplemented animals [16,17,59]. Administration of large amounts of iron to piglets resulted in a significant increase in hepcidin expression, which appeared immediately (only one day) after the injection of FeDex and was sustained at high levels up to weaning (day 28 after birth). In contrast, in anemic piglets hepcidin was hardly detectable in the blood plasma [16,59]. Our observation suggests that in piglets abundantly supplemented with iron, absorption of this microelement from the diet may be reduced. This could be a potentially unfavorable phenomenon especially in the second part of the early postnatal period (from day 14 following birth up to weaning), when voluntary intake of solid feed (containing usually high amounts of inorganic iron) by piglets is increased and the diet becomes a valuable source of exogenous iron. With the aim to correct iron deficiency in piglets without increasing hepcidin expression, we have proposed a modified procedure of FeDex administration, which involves double injection of a carefully calculated, reduced amount FeDex on day 3 and 14 after birth. Although this procedure has been shown to achieve the objectives, its application in the practice is questionable due to labor considerations at farms [59].

2.2. Oral Supplementation

“Supplementation” with soil iron. Rooting is a natural behavior for pigs frequently used at all ages. Pigs root in the soil in different ways for different reasons including searching for food. Iron is a relatively abundant element (20–40 g/kg) of the soil [60], which is considered a valuable source of this nutrient (mineral) for wild boar piglets living in their natural woodland habitat. In contrast, modern indoor farming systems prevent contact of piglets with soil and thus deprive them access to this source of iron. It has been suggested that in outdoor production iron supplementation of piglets occurs at least in part by ingesting this microelement from the soil [61]. However, experiments

conducted on a large number of piglets (more than 2300 per group) clearly showed that outdoor-reared animals still need parenteral iron supplementation with FeDex, otherwise they develop anemia (Hgb level—5.1 g/dL) and show increased mortality [21]. Other studies demonstrated that environmental iron, ingested from the soil plays an essential role in maintaining correct iron status in domestic piglets during the pre-weaning period [62].

Iron supplements as feed additives. Over the years, various dietary iron supplements such as iron salts [63], iron chelates [13], carbonyl iron [64], iron polymaltose [65], and iron microparticles [66] have been used to prevent/treat IDA in piglets. Despite such huge diversity of oral iron supplements, there is a general consensus that dietary supplementation with iron is less efficient in rectifying hematological status of piglets compared with parenteral one (reviewed in [10]). On the other hand, supplementation *per os*, when it is based on voluntary intake of feed containing supplemental iron, it is a non-stressful, less time-consuming procedure, which avoids possible risks of iatrogenic disease transmission. However, low consumption of solid feed or drinking water by piglets during the first two weeks after birth strongly reduces the therapeutic efficiency of this strategy despite using various feeding devices and chemical attractants [17,67]. Although applying of excessive doses of supplemental iron added to the feed has been shown to improve iron status in piglets at a rate comparable to FeDex injection [67], the usefulness of this method seems to be doubtful because of strong adverse side effects observed mainly at the level of gastrointestinal tract and liver [68]. Regarding the oral route, iron can be also individually delivered to piglets in the form of a paste directly into the mouth [69]. In this case, the amount of administered iron can be tightly controlled. However, reports on the labor consumption of this procedure and its influence on the welfare of supplemented animals are controversial [70,71].

Despite several limitations in oral supplementation of piglets with iron, the search is ongoing for new iron supplements characterized by high bioavailability and potentially overcoming canonical pathways of iron absorption. In some sense, heme is a good candidate for such new although already long known iron supplement. Heme, a ferrous iron protoporphyrin IX complex, is employed as a prosthetic group in diverse proteins (including hemoglobin) that participate in important biological processes [72]. On one side, dietary heme uptake has been recognized for more than 60 years [73] and many studies have since confirmed that in mammals (except from mice [74]) absorption of heme is far more efficient than that of inorganic iron [73]. Accordingly, heme iron has been successfully used as iron supplement to treat iron deficiency in humans [75,76]. On the other hand, the use of heme iron to prevent IDA in piglets has not attracted much interest from pig breeders. Nevertheless, some studies [17,66,77] including our own [17] clearly showed that supplementation of piglets based on voluntary intake of hemoglobin from the feed can rescue these animals from severe IDA (piglets maintained hemoglobin level at 8 g/dL throughout the experimental period i.e., from day 3 to day 28 after birth) despite the reduced intake of solid feed during the first 10 days postpartum [17]. Importantly, dietary supplementation with hemoglobin promoted combating of severe IDA in piglets without inducing a disadvantageous increase in hepcidin expression [17]. We proposed that the well-known high bioavailability of heme iron may depend on a split pathway mediating the transport of heme-derived elemental iron as well as intact heme from the interior of duodenal enterocytes to the bloodstream.

The use of encapsulation technologies has been proposed not only to improve bioavailability of supplemental iron delivered by the oral route [78] but also to decrease its adverse effects in the gastrointestinal tract, due to the oxidative toxicity of ferrous iron [68]. Some of the novel oral iron supplements developed by encapsulating in various kinds of matrix inorganic and heme iron have been tested on anemic piglets and found to improve RBC indices [66,79]. Among encapsulation technologies, liposomes, bilayer phospholipid vesicles, have attracted much interest as efficient drug delivery systems [80]. In our recent studies we successfully used liposomal iron (Sideral®Pharmanutra, Pisa, Italy), a new generation iron (ferric phosphate) supplement containing phospholipids and sucrose esters of fatty acids, assuring its high bioavailability and tolerability [81]. The efficacy of this drug in correcting iron deficiency attested by the restoration of physiological hemoglobin levels has been

proven in human and animal studies [82,83]. We show that liposomal iron given orally to suckling piglets is a suitable feed additive for the reinforcement of iron status in piglets in the critical period from birth to weaning. Oral supplementation with liposomal iron is not only as effective as the parenteral one with FeDex, but in addition it seems to be less toxic [55].

3. Concluding Remarks

Intramuscular administration of large amounts of FeDex to suckling piglets is long-established and commonly considered most favorable procedure used for preventing/treatment of IDA in the neonatal/early postnatal period. Here, we propose reconsidering this routine supplementation in the light of recent advances in molecular understanding of homeostatic regulation of iron in mammals [84], including mammalian neonates [85,86]. Our concept of optimal prophylaxis/treatment of IDA in suckling piglets is outlined in Figure 2. The main objective of iron supplementation is to meet current needs of this microelement for erythropoiesis, a physiological process consuming large amounts of iron. It seems that rebuilding of depleted hepatic iron stores of suckling piglets with supplemental iron is physiologically less important and plays a secondary role. The process of replenishment of iron reservoirs should proceed gradually and be driven by dietary iron contained in the basal feed routinely given to piglets during rearing. This approach will allow the reduction of the amount of supplemental iron administered to piglets. Lower dose iron given to piglets will primarily decrease its toxicity but will also minimize hepcidin expression and in consequence, maximize both natural iron absorption from the gut and supply of iron recovered from reticuloendothelial macrophages. Finally, when providing exogenous iron to piglets, we cannot leave aside neither the economical aspect of this procedure nor piglet welfare. In this context, oral supplementation based on voluntary intake of iron compounds added to the feed seems to be an optimal solution. However, major obstacles standing on this way are poor intake of solid feed by piglets during the first two weeks after birth, and neonatal immaturity of the piglets' absorption molecular mechanisms. For this reason, there is a need to test the therapeutic efficacy of new iron supplements such as iron nanoparticles and encapsulated iron compounds overcoming canonical pathways of iron absorption. Importantly, considering that pig is a recognized model for human nutrition [87,88], we propose that piglet model of "physiological" IDA may be useful in preclinical studies for testing various iron food supplements in humans.

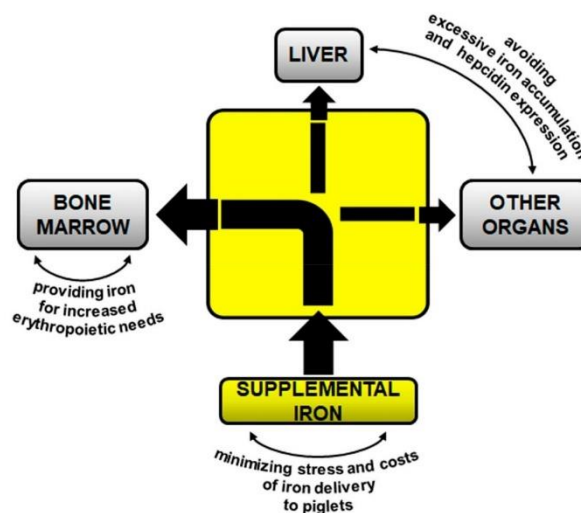


Figure 2. Main objectives of sustainable iron supplementation in suckling piglets. See description in the text for details.

Author Contributions: Conceptualization, P.L., R.R.S., and M.S.; writing—original draft preparation, P.L.; writing—review & editing, R.R.S., M.S., A.J., R.M., and M.L.; visualization, M.S.; project administration, R.R.S.

Funding: This work was supported by the National Science Centre, Poland (grant No. 2017/25/B/NZ9/01707).

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest with respect to this review manuscript.

References

- Camaschella, C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev.* **2016**, *31*, 225–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Strauss, R.G. Anaemia of prematurity: Pathophysiology and treatment. *Blood Rev.* **2010**, *24*, 221–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Venn, J.A.J.; McCance, R.A.; Widdowson, E.M. Iron metabolism in piglet anemia. *J. Comp. Pathol.* **1947**, *5*, 314–325. [[CrossRef](#)]
- Svoboda, M.; Drabek, J. Iron deficiency in suckling piglets; ethiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Vet.* **2005**, *49*, 104–111.
- Kim, J.C.; Wilcock, P.; Bedford, M.R. Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2018**, *235*, 8–14. [[CrossRef](#)]
- Boussingault, J.B. Du ironr contenu dans le sang et dans les aliments. *Acad. Sci. Parts Rend. Acad. Sci.* **1872**, *74*, 1353.
- McGovan, J.P.; Crichton, A. Iron deficiency in pigs. *Biochem. J.* **1924**, *18*, 265–272. [[CrossRef](#)]
- Hart, E.B.C.; Elvehjem, C.A.; Steenbock, H.; Bohstedt, G.; Fargo, J.M. Anemia in suckling pigs. *J. Anim. Sci.* **1929**, *409*. [[CrossRef](#)]
- Svoboda, M.; Vaňhara, J.; Berlinská, J. Parenteral iron administration in suckling piglets—A review. *Acta Vet. Brno* **2017**, *86*, 249–261. [[CrossRef](#)]
- Svoboda, M.; Piskova, K. Oral iron administration in suckling piglets—A review. *Acta Vet. Brno* **2018**, *87*, 77–83. [[CrossRef](#)]
- Godryń, D.; Pieszka, M.; Lipiński, P.; Starzyński, R.R. Diagnostics of iron deficiency anaemia in piglets in the early postnatal period—A review. *Anim. Sci. Pap. Rep.* **2016**, *34*, 1–12.
- Egeli, A.K.; Framstad, T.; Morberg, H. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Vet. Scand.* **1998**, *39*, 381–393. [[PubMed](#)]
- Kegley, E.B.; Spears, J.W.; Flowers, W.L.; Schoenherr, W.D. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig. *Nutr. Res.* **2002**, *22*, 1209–1217. [[CrossRef](#)]
- Steinhardt, M.; Bünger, U.; Furcht, G.; Schönfelder, E. Determination of normal red blood picture values in piglets. *Arch. Exp. Veterinarmed.* **1982**, *36*, 707–719. [[PubMed](#)]
- Lipiński, P.; Starzyński, R.R.; Canonne-Hergaux, B.; Tudek, R.; Oliński, P.; Kowalczyk, P.; Działam, T.; Thibaudeau, O.; Gralak, M.A.; Smuda, E.; et al. Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 1233–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Staroń, R.; Van Swelm, R.P.L.; Lipiński, P.; Gajowiak, A.; Lenartowicz, M.; Bednarz, A.; Gajewska, M.; Pieszka, M.; Laarakkers, C.M.; Swinkels, D.W.; Starzyński, R.R. Urinary hepcidin levels in iron-deficient and iron-supplemented piglets correlate with hepcidin hepatic mRNA and serum levels and with body iron status. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Staroń, R.; Lipiński, P.; Lenartowicz, M.; Bednarz, A.; Gajowiak, A.; Smuda, E.; Krzeptowski, W.; Pieszka, M.; Korolonek, T.; Hamza, I.; et al. Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: Duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181117.
- Egeli, A.K.; Framstad, T. An evaluation of iron-dextran supplementation in piglets administered by injection on the first, third or fourth day after birth. *Res. Vet. Sci.* **1999**, *66*, 179–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rincker, M.J.; Clarke, S.L.; Eisenstein, R.S.; Link, J.E.; Hill, G.M. Effects of iron supplementation on binding activity of iron regulatory proteins and the subsequent effect on growth performance and indices of hematological and mineral status of young pigs. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83*, 2137–2145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jolliff, J.S.; Mahan, D.C. Effect of injected and dietary iron in young pigs on blood hematology and postnatal pig growth performance. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 4068–4080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Szabo, P.; Bilkei, G. Iron deficiency in outdoor pig production. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **2002**, *49*, 390–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Rao, R.; Georgieff, M.K. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2007**, *12*, 54–63. [CrossRef] [PubMed]
23. McPherson, R.L.; Ji, F.; Wu, G.; Blanton, J.R.; Kim, S.W. Growth and compositional changes of fetal tissues in pigs. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 2534–2540. [CrossRef] [PubMed]
24. Polish Pig Breeders and Producers Association “POLSUS”. Performance Results Pigs. 2017, pp. 17–21. Available online: <https://polsus.pl/images/photos/Wydawnictwa/Wyniki%20Oceny/2017/WynikiOcenyTCh2017.pdf> (accessed on 22 November 2018).
25. Fernández-Llario, P.; Mateos-Quesada, P. Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriol.* **1998**, *43*, 439–444. [CrossRef]
26. Larson, G.; Dobney, K.; Albarella, U.; Fang, M.; Matisoo-Smith, E.; Robins, J.; Lowden, S.; Finlayson, H.; Brand, T.; Willerslev, E.; et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. **2005**, *307*, 1618–1621. [CrossRef] [PubMed]
27. Cao, C.; Fleming, M.D. The placenta: The forgotten essential organ of iron transport. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 421–431. [CrossRef] [PubMed]
28. Brady, P.S.; Ku, P.K.; Ullrey, D.E.; Miller, E.R. Evaluation of an amino acid-iron chelate hematinic for the baby pig. *J. Anim. Sci.* **1978**, *47*, 1135–1140. [CrossRef] [PubMed]
29. Pfau, A.; Rudolph, K. Modelluntersuchungen zur oralen Eisensupplementierung beim Saugferkel. *Zuchtungskd.* **1978**, *50*, 227–233.
30. Braude, R.; Chamberlain, A.G.; Kotarbińska, M.; Mitchell, K.G. The metabolism of iron in piglets given labelled iron either orally or by injection. *Br. J. Nutr.* **1962**, *16*, 427–449. [CrossRef] [PubMed]
31. Pond, W.G.; Lowery, R. S.; Maner, J.H.; Looslu, J.K. Parental iron administration to sows during gestation and lactation. *J. Anim. Sci.* **1961**, *20*, 747–750. [CrossRef]
32. Leong, W.I.; Bowlus, C.L.; Tallkvist, J.; Lönnnerdal, B. DMT1 and FPN1 expression during infancy: Developmental regulation of iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2003**, *285*, G1153–G1161. [CrossRef] [PubMed]
33. Leong, W.I.; Bowlus, C.L.; Tallkvist, J.; Lönnnerdal, B. Iron supplementation during infancy—effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *8*, 1203–1211. [CrossRef] [PubMed]
34. Lopez, V.; Suzuki, Y.A.; Lönnnerdal, B. Ontogenic changes in lactoferrin receptor and DMT1 in mouse small intestine: Implications for iron absorption during early life. *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84*, 337–344.
35. Gunshin, H.; MacKenzie, B.; Berger, U.V.; Gunshin, Y.; Romero, M.F.; Boron, W.F.; Nussberger, S.; Gollan, J.L.; Hediger, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **1997**, *388*, 482–488. [CrossRef] [PubMed]
36. McKie, A.T. The role of Dcytb in iron metabolism: An update. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1239–1241. [CrossRef] [PubMed]
37. Drakesmith, H.; Nemeth, E.; Ganz, T. Ironing out ferroportin. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 777–787. [CrossRef] [PubMed]
38. Vulpe, C.D.; Kuo, Y.M.; Murphy, T.L.; Cowley, L.; Askwith, C.; Libina, N.; Gitschier, J.; Anderson, G.J. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 195–199. [CrossRef] [PubMed]
39. Gunshin, H.; Starr, C.N.; Drenzo, C.; Fleming, M.D.; Jin, J.; Greer, E.L.; Sellers, V.M.; Galica, S.M.; Andrews, N.C. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood* **2005**, *106*, 2879–2883. [CrossRef] [PubMed]
40. Ganz, T.; Nemeth, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1823*, 1434–1443. [CrossRef] [PubMed]
41. Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; Ward, D.M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. **2004**, *306*, 2090–2093. [CrossRef] [PubMed]
42. Vanoaica, L.; Darshan, D.; Richman, L.; Schümann, K.; Kühn, L.C. Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metab.* **2010**, *12*, 273–282. [CrossRef] [PubMed]
43. Galy, B.; Ferring-Appel, D.; Becker, C.; Gretz, N.; Gröne, H.J.; Schümann, K.; Hentze, M.W. Iron regulatory proteins control a mucosal block to intestinal iron absorption. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 844–857. [CrossRef] [PubMed]

44. Granick, S. Ferritin; increase of the protein apoferritin in the gastrointestinal mucosa as a direct response to iron feeding; the function of ferritin in the regulation of iron absorption. *J. Biol. Chem.* **1946**, *164*, 737–746. [\[PubMed\]](#)
45. Harrison, P.M.; Arosio, P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 161–203. [\[CrossRef\]](#)
46. Mastrogiannaki, M.; Matak, P.; Keith, B.; Simon, M.C.; Vaulont, S.; Peyssonnaud, C. HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1159–1166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Mastrogiannaki, M.; Matak, P.; Peyssonnaud, C. The gut in iron homeostasis: Role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood* **2013**, *122*, 885–892. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Manzoni, P.; Dall'Agnola, A.; Tomé, D.; Kaufman, D.A.; Tavella, E.; Pieretto, M.; Messina, A.; De Luca, D.; Bellaiche, M.; Mosca, A.; et al. Role of lactoferrin in neonates and infants: An update. *Am. J. Perinatol.* **2018**, *35*, 561–565. [\[PubMed\]](#)
49. Suzuki, Y.A.; Shin, K.; Lönnnerdal, B. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15771–15779. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Liao, Y.; Lopez, V.; Shafizadeh, T.B.; Halsted, C.H.; Lönnnerdal, B. Cloning of a pig homologue of the human lactoferrin receptor: Expression and localization during intestinal maturation in piglets. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **2007**, *148*, 584–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Yu, I.T.; Lin, J.; Wu, J.F.; Yen, H.T.; Lee, S.L.; Yang, T.S. Reevaluation of the necessity of iron injection to newborn piglets. *Asian-Australas. Anim. Sci.* **2002**, *15*, 79–83. [\[CrossRef\]](#)
52. Geisser, P.; Baer, M.; Schaub, E. Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations. *Arzneimittelforschung* **1992**, *42*, 1439–1452. [\[PubMed\]](#)
53. Katkiewicz, M.; Malicka, E.; Preibisch, J. Effect of iron overload on the morphology of some organs in piglets. *Pol. Arch. Vet.* **1986**, *25*, 75.
54. Kruszewski, M.; Iwanenko, T.; Bartłomiejczyk, T.; Woliński, J.; Starzyński, R.R.; Gralak, M.A.; Zabielski, R.; Lipiński, P. Hepatic iron content corresponds with the susceptibility of lymphocytes to oxidative stress in neonatal pigs. *Mutat. Res.* **2008**, *657*, 146–149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Starzyński, R.; Szudzik, M.; Staroń, R.; Jonczy, A.; Smuda, E.; Pieszka, M.; Kamyczek, M.; Lipiński, P. Comparison of the therapeutic potential of oral sucrosomial iron and parenteral iron dextran supplementations in neonatal iron deficiency anemia in pigs. *Am. J. Hematol.* **2017**, *92*, E286–E286.
56. Velásquez, J.L.; Aranzazu, D. An acute case of iron toxicity on newborn piglets from vitamin E/Se deficient sows. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* **2004**, *17*, 60–62.
57. Ueberschär, S. Sudden death in suckling piglets following administration of iron-dextran. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **1966**, *73*, 145–50. [\[PubMed\]](#)
58. Moretti, D.; Goede, J.S.; Zeder, C.; Jiskra, M.; Chatzinakou, V.; Tjalsma, H.; Melse-Boonstra, A.; Brittenham, G.; Swinkels, D.W.; Zimmermann, M.B. Oral iron supplements increase hepcidin and decrease iron absorption from daily or twice-daily doses in iron-depleted young women. *Blood* **2015**, *126*, 1981–1989. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Starzyński, R.R.; Laarakkers, C.M.; Tjalsma, H.; Swinkels, D.W.; Pieszka, M.; Styś, A.; Mickiewicz, M.; Lipiński, P. Iron supplementation in suckling piglets: How to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64022. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Colombo, C.; Palumbo, G.; He, J.-Z.; Pinton, R.; Cesco, S. Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J. Soils Sediments* **2014**, *14*, 538. [\[CrossRef\]](#)
61. Bilkei, G. The management of veterinary extension activities and the practical experiences of pig breeding advisory bureaux in western Europe. In Proceedings of the Pig Days, Budapest, Hungary, 3–4 April 1996; Bilkei, G., Ed.; Self Publishing: Budapest, Hungary; pp. 1–3.
62. Kleinbeck, S.N.; McGlone, J.J. Intensive indoor versus outdoor swine production systems: Genotype and supplemental iron effects on blood hemoglobin and selected immune measures in young pigs. *J. Anim. Sci.* **1999**, *77*, 2384–2390. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Rincker, M.J.; Hill, G.M.; Link, J.E.; Rowntree, J.E. Effects of dietary iron supplementation on growth performance, hematological status, and whole-body mineral concentrations of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 3189–3197. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Svoboda, M.; Ficek, R.; Synková, B.; Drábek, J. Efficiency of carbonyl iron in prevention of anaemia in piglets. *Acta Vet. Brno* **2007**, *76*, 179–185. [\[CrossRef\]](#)

65. Svoboda, M.; Ficek, R.; Drábek, J. Evaluation of the efficacy of iron polymaltose complex in the prevention of anaemia in piglets. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2008**, *52*, 119–123.
66. Antileo, R.; Figueroa, J.; Valenzuela, C. Characterization of a novel encapsulated oral iron supplement to prevent iron deficiency anemia in neonatal piglets. *J. Anim. Sci.* **2016**, *94*, 157–160. [\[CrossRef\]](#)
67. Maes, D.; Steyaert, M.; Vanderhaeghe, C.; López Rodríguez, A.; de Jong, E.; Del Pozo Sacristán, R.; Vangroenweghe, F.; Dewulf, J. Comparison of oral versus parenteral iron supplementation on the health and productivity of piglets. *Vet. Rec.* **2011**, *168*, 188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Zödl, B.; Sargazi, M.; Zeiner, M.; Roberts, N.B.; Steffan, I.; Marktl, W.; Ekmekcioglu, C. Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 143–147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Loh, T.; Leong, K.; Too, H.; Mah, C.; Choo, P. The effects of iron supplementation in preweaning piglets. *Malays. J. Nutr.* **2001**, *7*, 41–49.
70. Marchant, J.N.; Broom, D.M.; Corning, S. The influence of sow behaviour on piglet mortality due to crushing in an open farrowing system. *Anim. Sci.* **2001**, *72*, 19–28. [\[CrossRef\]](#)
71. Valenzuela, C.; Lagos, G.; Figueroa, J.; Tadich, T. Behavior of suckling pigs supplemented with an encapsulated iron oral formula. *J. Vet. Behav.* **2016**, *13*, 6–9. [\[CrossRef\]](#)
72. Lin, Y.W.; Wang, J. Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *129*, 162–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Anderson, G.J.; Frazer, D.M.; McKie, A.T.; Vulpe, C.D.; Smith, A. Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: Lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biomaterials* **2005**, *18*, 339–348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Fillebeen, C.; Gkouvatso, K.; Fragoso, G.; Calvé, A.; Garcia-Santos, D.; Buffle, R.M.; Becker, C.; Schumann, K.; Ponka, P.; Santos, M.M.; Pantopoulos, K. Mice are poor heme absorbers and do not require intestinal Hmox1 for dietary heme iron assimilation. *Haematologica* **2015**, *100*, e334–e337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. González-Rosendo, G.; Polo, J.; Rodríguez-Jerez, J.J.; Puga-Díaz, R.; Reyes-Navarrete, E.G.; Quintero-Gutiérrez, A.G. Bioavailability of a heme-iron concentrate product added to chocolate biscuit filling in adolescent girls living in a rural area of Mexico. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H73–H78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Young, M.F.; Griffin, I.; Pressman, E.; McIntyre, A.W.; Cooper, E.; McNanley, T.; Harris, Z.L.; Westerman, M.; O'Brien, K.O. Utilization of iron from an animal-based iron source is greater than that of ferrous sulfate in pregnant and nonpregnant women. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 2162–2166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Quintero-Gutiérrez, A.G.; González-Rosendo, G.; Sánchez-Muñoz, J.; Polo-Pozo, J.; Rodríguez-Jerez, J.J. Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int. J. Biol. Sci.* **2008**, *4*, 58–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Zimmermann, M. The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: A review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2004**, *74*, 453–461. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Bryszewska, M.A.; Laghi, L.; Zannoni, A.; Gianotti, A.; Barone, F.; Taneyo Saa, D.L.; Bacci, M.L.; Ventrella, D.; Forni, M. Bioavailability of microencapsulated iron from fortified bread assessed using piglet model. *Nutrients* **2017**, *9*, 272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Pisani, A.; Riccio, E.; Sabbatini, M.; Andreucci, M.; Del Rio, A.; Visciano, B. Effect of oral liposomal iron versus intravenous iron for treatment of iron deficiency anaemia in CKD patients: A randomized trial. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2015**, *30*, 645–652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Giordano, G.; Mondello, P.; Tambaro, R.; Perrotta, N.; D'Amico, F.; D'Aveta, A.; Berardi, G.; Carabellese, B.; Patriarca, A.; Corbi, G.M.; et al. Biosimilar epoetin α is as effective as originator epoetin- α plus liposomal iron (Sideral[®]), vitamin B12 and folates in patients with refractory anemia: A retrospective real-life approach. *Mol. Clin. Oncol.* **2015**, *3*, 781–784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Parisi, F.; Berti, C.; Mandò, C.; Martinelli, A.; Mazzali, C.; Cetin, I. Effects of different regimens of iron prophylaxis on maternal iron status and pregnancy outcome: A randomized control trial. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2017**, *30*, 1787–1792. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Muckenthaler, M.U.; Rivella, S.; Hentze, M.W.; Galy, B. A red carpet for iron metabolism. *Cell* **2017**, *168*, 344–361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Lipiński, P.; Stys, A.; Starzyński, R.R. Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 23–38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

86. Collard, K.J. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics* **2009**, *123*, 1208–1216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Miller, E.R.; Ullrey, D.E. The pig as a model for human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **1987**, *7*, 361–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Schook, L.; Beattie, C.; Beever, J.; Donovan, S.; Jamison, R.; Zuckermann, F.; Niemi, S.; Rothschild, M.; Rutherford, M.; Smith, D. Swine in biomedical research: Creating the building blocks of animal models. *Anim. Biotechnol.* **2005**, *16*, 183–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A2. Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters, and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs

Biological Trace Element Research (2020) 196:472–480
<https://doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w>



Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters, and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs

Mateusz Szudzik¹ · Paweł Lipiński¹ · Aneta Jończy¹ · Rafał Mazgaj¹ · Marek Pieszka² · Marian Kamyczek³ · Ewa Smuda¹ · Rafał R. Starzyński¹

Received: 15 August 2019 / Accepted: 22 October 2019 / Published online: 8 November 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Heme is an efficient dietary iron supplement applied in humans and animals to prevent iron deficiency anemia (IDA). We have recently reported that the use of bovine hemoglobin as a dietary source of heme iron efficiently counteracts the development of IDA in young piglets, which is the common problem in pig industry. Here, we used maternal Polish Large White and terminal sire breed (L990) pigs differing in traits for meat production to evaluate the long-term effect of split supplementation with intramuscularly administered small amount of iron dextran and orally given hemoglobin on hematological indices, iron status, growth performance, slaughter traits, and meat quality at the end of fattening. Results of our study show that in pigs of both breeds split supplementation was effective in maintaining physiological values of RBC and blood plasma iron parameters as well as growth performance, carcass parameters, and meat quality traits. Our results prove the effectiveness of split iron supplementation of piglets in a far-reach perspective.

Keywords Heme · Iron deficiency anemia · Pig · Supplementation · Slaughter performance · Meat quality

Introduction

Early postnatal iron deficiency anemia (IDA) is a widespread pathology in livestock affecting especially suckling piglets [1, 2]. The common cause of iron deficiency in newborn piglets is a striking imbalance between high iron demand and inadequate iron supply. Huge iron requirements during the first few weeks after birth (7–16 mg Fe/piglet/day) [2, 3] result from the selection of piglets for a large litter size, high birth weight, rapid growth and in consequence greater blood volume, and increased red blood cells (RBC) count. Considering that RBC are the largest reservoir of iron in the body [2], meeting iron requirements for erythropoiesis from natural

iron-deficient sources such as hepatic iron stores [2, 4] and sow's milk [5, 6] is unreachable in suckling piglets [7]. Without iron supplementation piglets regularly become anemic within 2 weeks postpartum [2].

Intramuscular administration of large amount of iron dextran (FeDex) on days 3 to 6 postpartum is current practice in the swine industry, rectifying the hematological status of piglets [8–11]. However, routinely applied dose of 200 mg Fe per piglet in the form of a single intramuscular injection of FeDex seems not being efficiently metabolized and detoxified [8]. Moreover, we have previously reported that high iron parenteral supplementation with FeDex induces expression of hepcidin (Hepc) [8, 12, 13], a 25-amino acid peptide hormone, the master regulator of the systemic iron homeostasis in vertebrates [14]. It is well established that high Hepc may perturb body iron homeostasis by inhibiting both duodenal iron absorption and iron recycling by macrophages of the reticuloendothelial system (RES) that catabolize heme contained in phagocytosed senescent RBC [15]. In consequence of this two-way hepcidin-dependent regulation, availability of iron for erythropoiesis is strongly decreased.

To minimize both toxicity of supplemental iron and its capacity to induce hepcidin synthesis, we proposed several modifications of routine procedure of FeDex administration

✉ Rafał R. Starzyński
r.starzynski@ighz.pl

¹ Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Breeding PAS, ul. Postępu 36a, 05-552 Magdalenka, Jastrzębiec, Poland

² Department of Animal Nutrition & Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Kraków, Poland

³ Pig Hybridization Centre, National Research Institute of Animal Production, Pawłowice, Poland

to piglets [8, 12]. Furthermore, considering that heme preparations have been successfully used to prevent and treat IDA in humans [16–18], dogs [19], and pigs [20, 21], we used bovine hemoglobin as heme iron supplement. We showed that oral supplementation of piglets with hemoglobin rescues them from severe IDA observed in non-supplemented animals [22]. However, to strengthen the curative effect of dietary hemoglobin, we successfully used a split iron supplementation regime involving additional supportive injection of a small amount of FeDex on day 3 after birth. This modified procedure has been shown to better cover iron needs of 28-day-old piglets, i.e., at the age of weaning [22]. Indeed, most studies dealing with iron supplementation procedures in piglets evaluate their efficacy in animals during the period from birth to weaning [1, 2]. However, a final, far-reaching goal of iron supplementary procedures in pig breeding is to assure a permanent and durable iron balance in pigs until slaughter. Therefore, in this study, we evaluated a long-term effect of split (FeDex/hemoglobin) iron supplementation on RBC status, iron content in tissues (including skeletal muscles), and its impact on growth performance, carcass parameters, and meat quality traits of ~180-day-old (slaughter age) Polish Large White (PLW) and 990 line (L990) pigs. We used in our experiment these two Polish breeds considering their different characteristics of meat performance and distinct use in crossbreeding program in Poland [23]. In contrast to PLW, a typical maternal breed, L990 is exploited as a terminal sire breed [24]. Importantly, we compared our experimental supplementation with the procedure considered a gold standard in the therapy of IDA in pigs, involving intramuscular injection of high amount of iron in the form of FeDex.

We provide evidence that the experimental split iron supplementation of piglets, which is not fully effective at weaning, does not entail negative consequences for the maintenance of RBC indices, systemic iron status, growth performance, and meat quality of pigs at the end of fattening.

Materials and Methods

Animals and Experimental Design

Experiment was conducted at the Pig Hybridization Centre in Pawlowice (National Research Institute of Animal Production, Balice, Poland). The experimental procedures used in this study were in compliance with the EU guidelines for the care and handling of research animals (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). According to Polish legislation, tests on animals using feed additives and supplements (including iron supplements such as FeSO_4 , hemoglobin, dried erythrocytes, plasma, blood) are not considered research procedures and therefore do not interfere with animal welfare. Therefore, ethical permission is not required. A total

of 28 Polish Large White (PLW) and 990 line (L990) piglets (males) born from 6 sires (3 PLW and 3 L990) and 8 dams (4 PLW and 4 L990) from different litters, housed in standard conditions (70% humidity and a temperature of 22 °C in cages with straw bedding), were used. Until weaning (day 28 after birth) sows were allowed to nurse their piglets and piglets had no access to the sows' feed. The Prestarter Wigor 1 Plus feed (containing 238 mg Fe/kg as estimated by flame spectrometry) was offered to piglets from day 5 to day 45 after birth. Piglets from both breeds were allotted into the following 4 experimental groups (7 piglets per group) on the basis of balanced body weight at day 3 after birth: PLW and L990, piglets intramuscularly injected with 100 mg Fe/kg b.w. in the form of iron dextran, FeDex (Ferran 100, Vet-Agro, Lublin, Poland) on day 3 after birth (supplementation routinely applied to piglets at the Pig Hybridization Centre in Pawlowice); PLW and L990, piglets intramuscularly injected with 40 mg Fe/kg b.w. in the form of FeDex on day 3, and supplemented orally from day 3 to day 45 with bovine hemoglobin (Bovogen, East Keilor, Australia) added to the feed in the proportion 38 g hemoglobin per 1 kg of feed (split supplementation). The final total iron content in this mixture, assessed by flame atomic absorption spectroscopy was 612 mg Fe/kg. The mean daily consumption of feed per piglet and the respective calculated iron intake were monitored in the 4 experimental groups and did not differ significantly between animals (data not shown). After 45th day of life, piglets were fed with the following typical feeds offered to pigs during intensive fattening: starter (up to body weight 30 kg containing 150 mg Fe/kg feed), grower (until body weight 70 kg containing 100 mg Fe/kg feed), and finisher (until the day of slaughter containing 80 mg Fe/kg feed).

After reaching the slaughter weight—110 kg (on day ~180 after birth)—animals were transported to the slaughterhouse belonging to National Research Institute of Animal Production, Pig Hybridization Centre, and slaughtered by exsanguination after being electric stunned, then scalded, dehaired, eviscerated, and split down the midline according to commercial procedures.

Biological Sample Collection

Blood was drawn on day 28 after birth by venipuncture of the jugular vein (*vena jugularis externa*) and at slaughter using syringe with Li-Heparin (S-Monovette® with S-Monovette-Needle®). The blood samples were centrifuged (1200×g, 10 min, 4 °C) to separate the plasma. Plasma samples were immediately aliquoted and stored at -80 °C. Samples of the liver, spleen, kidney, heart, and skeletal muscles—*musculus longissimus thoracis et lumborum*, *musculus gluteus maximus*—were collected, rinsed with PBS, and then stored at -80 °C until they were used for biochemical analyses.

Measurement of Red Blood Cell Indices and Iron Parameters in the Blood Plasma

RBC indices were measured using ADVIA 2010 analyzer (Siemens, Germany). Iron concentration in the blood plasma and total iron binding capacity (TIBC) were determined by colorimetric measurement of the absorbance of the iron-chromasulur complex at 630 nm according to the manufacturer's protocol (Biomaxima S.A., Poland). Percent of transferrin saturation (TSAT) was then calculated according to the following formula: $TSAT = [\text{plasma iron}/\text{TIBC}] \times 100$.

Quantitative Measurement of Non-heme Iron Content in Tissues

The non-heme iron content of the liver, spleen, kidney, heart, and skeletal muscles (*gluteus maximus* and *longissimus thoracis et lumborum*) were determined using colorimetric assay as described previously [25].

Quantitative Measurement of Heme Iron Content in Longissimus Thoracis et Lumborum Muscle

The heme content of formic acid-solubilized tissues was determined spectrophotometrically at 398 nm using hemin standards prepared in formic acid and a molar absorption coefficient of $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [26].

Real-time Quantitative RT-PCR Analysis of Hepatic Hecidin mRNA Abundance and Blood Plasma Hecidin-25 Quantification

Hepatic hepcidin mRNA levels were measured by a real-time quantitative RT-PCR of cDNA derived from specific transcript in a Light Cycler U96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), using the pair of following primers: forward (5'-3') AAGACAGCTCACAGACCTCC, reverse (5'-3') CTACGTCTTGACGACATCC. The amplified products were detected using SYBR Green I (Roche Diagnostics) as described previously [22]. For data analysis Light Cycler U96 Software was used. Expression was quantified relative to that of a control transcript encoding the *glutathione reductase* (GSR) Forward (5'-3') CACAGCTCCTCACATCCTGA, Reverse (5'-3') GGGCAATTCTTCCAGCTGAA.

Measurement of hepcidin-25 level in the blood plasma was performed as described previously for porcine plasma samples [13] by a combination of weak cation exchange chromatography and time-of-flight mass spectrometry (WCX-TOF MS) [27].

Analysis of the Meat Quality and Production Traits

Immediately after slaughter, blood samples were collected as described for 28-day-old piglets. Samples of the duodenum, liver, spleen, kidney, and muscles were collected for further analyses. All carcass parameters were tested according to the methodology applied in Polish Pig Testing Stations as described by Różycki (1996) [28]. The following parameters were registered: average slaughter age, average daily gain (standardized on day 180 of age), slaughter yield, body weight at slaughter, half carcass weight, dressing percentage, meatiness percentage using CGM Sydel apparatus. Meat quality parameters such as loin "eye" area (LEA), backfat thickness (FT), and color/brightness were measured. On hot, hanging right carcass sides using slide caliper backfat thickness at points FTI to FTV were measured Borzuta (1998) [29]. For the LEA measurement, the cut has been made between the last thoracic vertebra and the first lumbar vertebrae and the contour of the muscle was done for planimeter assessment. Color/brightness of *longissimus thoracis et lumborum* muscle using MINOLTA CHROMA METERS CR 400. The instrument was calibrated against a standard white plate (8-mm-diameter aperture, d/0 illumination system, D65 illuminant and a 2° standard observer angle) determining L*color component (brightness) parameter was measured. Each measurement was performed 6 times. The mean value was used as the result.

Statistical Analysis

Results were statistically analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey-Kramer post hoc test using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The treatment was the fixed effect, and sires were the random effect in the statistical model. $P \leq 0.05$ was considered significant. Data are presented as mean values $\pm$ SE. Experiments were designed in two replicates.

Results and Discussion

Most iron supplementation procedures in piglets are designed to provide exogenous iron as early as on day 3–6 after birth and thus to prevent the development of IDA during first few weeks of life. Indeed, this period is critical for the maintenance of iron balance because of extremely high iron requirements to sustain hemoglobin synthesis in erythroid cells. Without supplementation, piglets may also show an impaired functioning of the immune system resulting in a greater susceptibility to infectious and parasitic diseases [30]. Most studies dealing with iron supplementation strategies in suckling piglets consider their effectiveness by evaluating RBC indices and iron status of piglets at weaning (in 4-week-old animals) [8–11] To our knowledge, little attention has been paid to the effect of

Table 1 Hematological indices of PLW and L990 28- and ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations

Breed ↓	Age (days) → Supplementation ↓	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)		HGB (g/dL)		HCT (%)		MCV (fL)	
		28	180	28	180	28	180	28	180
PLW	Iron dextran	6.5 $\pm$ 0.11	7.49 $\pm$ 0.18	12.02 $\pm$ 0.50	12.34 $\pm$ 0.38	26.12 $\pm$ 1.37	39.09 $\pm$ 1.24	43.55 $\pm$ 2.22	52.14 $\pm$ 0.85
	Split	6.05 $\pm$ 0.49	7.24 $\pm$ 0.41	8.04 $\pm$ 0.58**	11.93 $\pm$ 0.46	28.16 $\pm$ 1.96	38.29 $\pm$ 1.67	41.78 $\pm$ 1.82	53.14 $\pm$ 0.98
L990	Iron dextran	6.35 $\pm$ 0.27	8.48 $\pm$ 0.19*	9.5 $\pm$ 0.65*	13.77 $\pm$ 0.29*	31.21 $\pm$ 1.96*	43.79 $\pm$ 1.11*	43.80 $\pm$ 2.23	53.00 $\pm$ 0.78
	Split	5.90 $\pm$ 0.37	8.31 $\pm$ 0.18*	8.60 $\pm$ 0.56**	13.21 $\pm$ 0.19*	28.90 $\pm$ 1.66	43.56 $\pm$ 0.60*	42.10 $\pm$ 1.73	52.43 $\pm$ 0.71

Values are expressed as the means $\pm$ SE. RBC indices were determined for seven pigs of each treatment group. *RBC* red blood cell count, *HGB* hemoglobin level, *HCT* hematocrit, *MCV* mean corpuscular volume, *RDW* red blood cell distribution width, *MCH* mean corpuscular hemoglobin. * $P < 0.05$, significant differences between PLW and L990 pigs within a given supplementation group. ** $P < 0.05$, significant differences between pigs receiving split and routine supplementation within a given breed

pre-weaning iron supplementation on the status of this micro-element in pigs during the post-weaning period [31]. Meanwhile, it seems that in a long-term perspective iron repletion in pigs is important not only for their health but also for their growth performance and nutritional value of pork.

In the present study, we first aimed at evaluating the impact of an early split iron supplementation in piglets on both RBC and iron plasma parameters at the end of fattening, i.e., in approximately 180-day-old PLW and L990 pigs (Table 1 and Fig. 1). We hypothesized that although piglets receiving a combined supplementation are not fully replete with iron at weaning [22, 32 and this study—Table 1], during the post-weaning period they can accommodate iron absorption to sustain growth performance and iron content in tissues. Accordingly, it has been demonstrated that a few months pigs highly express apical (divalent metal transporter 1) and

basolateral (ferroportin) iron transporters not only on duodenal enterocytes but also on colonocytes [33]. Concentration of hemoglobin in 28-day-old piglets receiving split supplementation indicates that depending on various cut-off values, these animals are slightly below [34] or above [35] the border line of anemia (Table 1). It is noteworthy that blood plasma iron parameters indicate slight iron deficiency but only in PLW piglets (Fig. 1a–c). In contrast, piglets supplemented with high amount of FeDex definitely exhibit a non-anemic phenotype (Table 1). In our previous study we demonstrated that 28-day-old piglets supplemented exclusively with a single, low dose of FeDex (i.e., a parenteral component of split supplementation used in this study) are definitely iron deficient and show clear symptoms of IDA [13]. Assuming that IDA in these animals at weaning is far advanced, we considered them not suitable for investigating long-term effect of preweaning iron

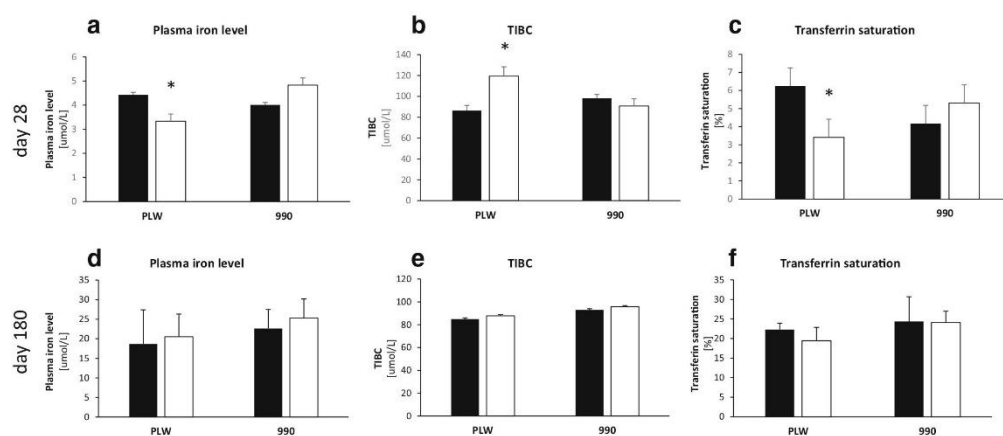


Fig. 1 Iron status in the blood plasma of PLW and L990 in 28-day-old and ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations. 28-day-old: (a) blood plasma iron; (b) total iron binding capacity (TIBC); (c) transferrin saturation; ~180-day-old: (d) blood plasma iron; (e) total iron binding capacity (TIBC); (f) transferrin saturation. Values are expressed

as the means $\pm$ SE for plasma samples obtained from 7 pigs from each experimental group. Solid bars, piglets supplemented with high-dose FeDex; open bars, piglets receiving split FeDex/hemoglobin supplementation

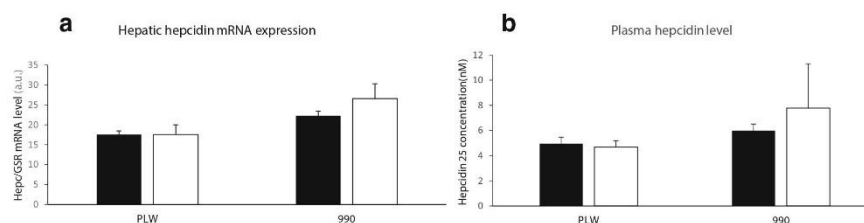


Fig. 2 Hepatic hepcidin mRNA expression and plasma hepcidin concentrations of PLW and L990 ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations: (a) hepatic hepcidin mRNA expression; (b)

plasma hepcidin concentrations. Solid bars, piglets supplemented with high-dose FeDex; open bars, piglets receiving split FeDex/hemoglobin supplementation

supplementation. Interestingly, at weaning piglets from two analyzed breeds within a given supplementation group show very similar RBC status, except higher level of HGB in PLW animals (Table 1). In contrast, at the end of fattening, L990 pigs display significantly higher values of the majority of RBC indices such as RBC count, hemoglobin concentration, and hematocrit values compared with PLW animals (Table 1). Most importantly, RBC parameters in finishing animals of both breeds receiving either routine or split supplementation do not differ significantly (Table 1). Similarly, iron status in the blood plasma of PLW and L990 adult pigs is comparable regardless supplementation procedure (Fig. 1d-f). Consequently, hepcidin mRNA expression as well as blood plasma concentration of hepcidin-25 in adult pigs shows no

statistically significant differences neither between pig breeds nor between supplementation groups (Fig. 2). These results clearly indicate that piglets receiving split supplementation and showing slightly anemic RBC status at weaning, during post-weaning period are able to improve RBC parameters, stabilize them within the physiological range [32, 36–38], and correct their iron status. This recovery attests a very efficient process of iron absorption from high iron-containing diets given to growing and finishing pigs (see the “Materials and Methods” section). Appropriate values of RBC indices are not always associated with iron repletion in tissues because erythroid compartment is on the first line of iron demand consuming major part of iron supply in the body [39]. Therefore, we measured iron content in tissues such as the

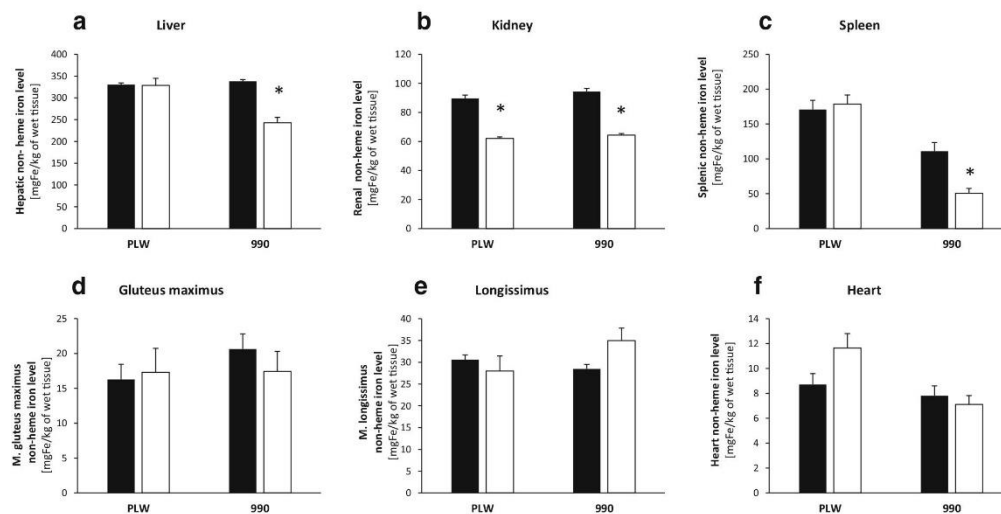


Fig. 3 Comparison of the tissular non-heme iron content in PLW and L990 ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations. Tissue non-heme iron content was measured in following tissues: (a) liver; (b) kidney; (c) spleen; (d) *gluteus maximus* muscle; (e) *longissimus thoracis et lumborum* muscle; and (f) heart. Values are expressed as the

means $\pm$ SE for tissue samples obtained from pigs of each group ($N = 7$). * $P < 0.05$, significant differences between pigs receiving split and routine supplementation within a given breed. Solid bars, piglets supplemented with high-dose FeDex; open bars, piglets receiving split FeDex/hemoglobin supplementation

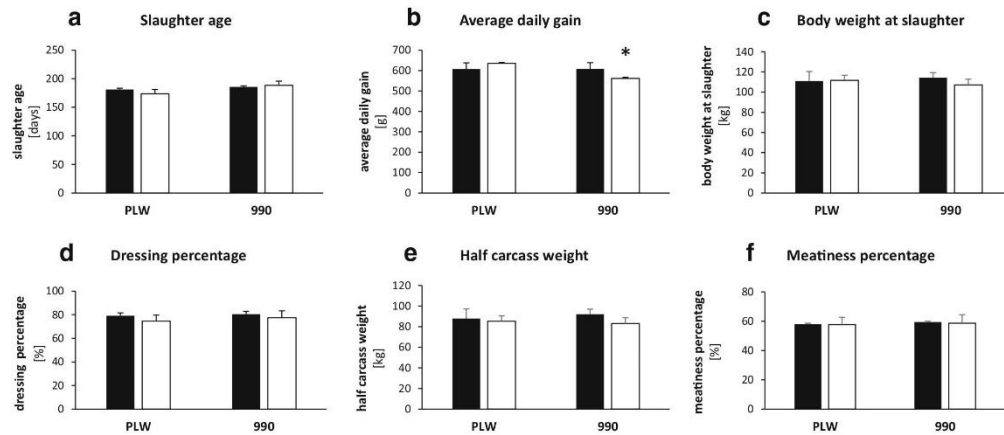


Fig. 4 Growth performance and carcass parameters in PLW and L990 ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations: (a) slaughter age; (b) average daily gain; (c) body weight at slaughter; (d) dressing percentage; (e) half carcass weight; and (f) meatiness percentage. Values are expressed as the means $\pm$ SE for pigs of each group ($N = 7$). * $P < 0.05$,

significant differences between pigs receiving split and routine supplementation within a given breed. Solid bars, piglets supplemented with high-dose FeDex; open bars, piglets receiving split FeDex/hemoglobin supplementation

liver, spleen, kidney, skeletal muscles, and heart and found statistically significant differences between animals from two supplementation groups in the kidney (lower iron content in pigs receiving split supplementation in both PLW and L990 breeds), in the spleen (lower iron content in L990 pigs supplemented with FeDex and hemoglobin), and in the liver (lower iron content in L990 pigs supplemented with hemoglobin) (Fig. 3). Interestingly, splenic iron content was significantly lower in L990 than in PLW pigs regardless the

supplementation and we hypothesized that this is connected with overall higher iron demand for erythropoiesis in L990 pigs showing higher RBC status compared with PLW animals (Table 1). Hemoglobin contained in erythrocytes accounts for the largest pool of heme and, consequently, iron. Bone marrow erythroblasts acquire more than 80% of plasma iron [39]. Therefore, higher RBC status of L990 piglets is associated with higher iron demand to maintain adequate erythropoiesis in these animals. According to Michalska et al. 2006 [40], pigs of L990 breed (a terminal sire breed) are also characterized by faster growth rate than animals belonging to PLW breed (maternal breed) and it could be an additional factor of greater iron requirements of these animals.

Considering that pork meat is a valuable source of iron for consumers, it is noteworthy that split supplementation did not result in lower iron content of skeletal muscles such as *musculus longissimus thoracis et lumborum* and *musculus gluteus maximus* in PLW and L990 pigs compared with commonly used high FeDex supplementation (Figs. 3d, e and 5). The slaughter age of pigs was similar among treatments and breeds (Fig. 4a). Comparing to classical supplementation with high dose of FeDex, split FeDex/hemoglobin procedure supported similar average daily gain (Fig. 4b) and final body weight of PLW pigs (Fig. 4c). However, in L990 pigs receiving split supplementation, average daily gain was significantly lower ($P < 0.05$) suggesting that this supplementation does not fully support the fast growth of these animals [40–42]. Apparently, basal iron content in diets for grower-finisher pigs is largely sufficient to compensate for moderate deficiency at weaning and to sustain both normal growth and slaughter

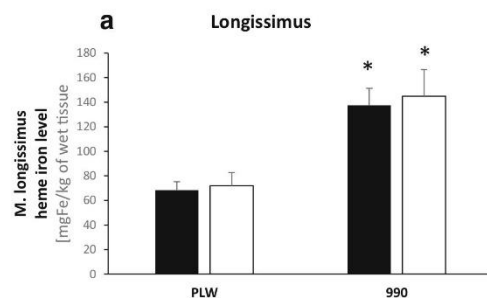


Fig. 5 Comparison of the *longissimus thoracis et lumborum* muscle heme iron content in PLW and L990 ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations. Musculoskeletal heme iron content was measured in (a) *longissimus thoracis et lumborum* muscle. Values are expressed as the means $\pm$ SE for pigs of each group ($N = 7$). * $P < 0.05$, significant differences between PLW and L990 pigs within a given supplementation group. Solid bars, piglets supplemented with high-dose FeDex; open bars, piglets receiving split FeDex/hemoglobin supplementation

Table 2 Backfat thickness from 5 measurements and selected meat quality parameters in PLW and L990 ~180-day-old pigs receiving various iron supplementations

Breed ↓	Parameter → Supplementation ↓	FT1 (cm)	FT2 (cm)	FT3 (cm)	FT4 (cm)	FT5 (cm)	FTav (cm)	LEA (cm ²)	Color brightness (%)
PLW	Iron dextran	3.09 ± 0.42	1.88 ± 0.19	2.36 ± 0.38	1.38 ± 0.12	1.97 ± 0.03	2.16	57.60 ± 2.27	53.48 ± 1.21
	Split	2.87 ± 0.38	1.70 ± 1.03	2.16 ± 0.12	1.33 ± 0.11	2.03 ± 0.07	2.02	53.14 ± 2.19	54.68 ± 1.42
L990	Iron dextran	3.29 ± 0.19	2.04 ± 0.53	2.49 ± 0.12	1.47 ± 0.09	2.23 ± 0.16	2.32	56.79 ± 2.07	55.40 ± 1.17
	Split	3.21 ± 0.20	1.93 ± 0.56	2.45 ± 0.19	1.30 ± 0.08	1.83 ± 0.12	2.14	55.73 ± 1.96	55.68 ± 2.18

Animal quality traits were measured as described in the “Materials and Methods” section. Values are expressed as the means ± SE for pigs of each group ($N = 7$)

performance in PLW but not in L990. It is highly probable that this phenomenon is associated with the high iron demand of this breed for erythropoiesis. Red blood cell indices in L990 piglets/pigs are significantly higher compared with PLW animals (Table 1). Apart from high erythroid iron acquisition, greater need for iron in L990 piglets may result from the use of large amounts of this microelement to sustain heme and myoglobin synthesis in muscle tissue (see Fig. 5 heme iron content). Iron transport to the bone marrow is dependent on endocytosis of diferric transferrin ($Tf-Fe_2$) via the transferrin receptor 1 (TFR1) abundantly expressed on erythroid cell [39]. The preferential movement of iron to the bone marrow (at the expense of other tissues) may result in a lower content of this biometal in the liver and kidney (Fig. 3) and may be also responsible for a slight growth retardation (Fig. 4).

Importantly, addition of iron to post-weaning basal diets increasing its content above NRC requirements [43, 44] has been shown dispensable for the improvement of growth performance of pigs, carcass characteristics, and pork quality [21, 45]. However, in contrast to elemental iron (ferrous sulfate), supplemental heme iron given to pigs starting from week 5 after birth favored greater body weight of animals on week 20 after birth suggesting better bioavailability of heme iron than that of elemental iron [46]. It is well known that meat color is a relevant factor that affects meat quality [47]. Meat color is mainly determined by myoglobin, which is the dominant pigment in the skeletal muscle [48]. Interestingly, supplemental heme has been also shown to increase the redness and myoglobin level (which is the main source of heme iron in skeletal muscles) of *longissimus thoracis et lumborum* muscle of 2-month-old piglets when compared with ferrous sulfate as elemental iron source [46].

According to Blicharski et al. (2014) [47] and Borzuta and Lisiak (2016) [49] and as shown in this study (Fig. 4), carcass parameters of PLW and L990 pigs traditionally supplemented with FeDex do not differ significantly. Here, in addition, we show that main meat quality parameters such as loin “eye” area (LEA), color/brightness of meat, backfat thickness, and heme iron level of *longissimus thoracis et lumborum* in pigs of both breeds receiving split FeDex/heme supplementation are very similar to those measured in at slaughter in animals

traditionally supplemented with high amount of FeDex (Table 2 and Fig. 5). Therefore, it is tempting to propose that split supplementation could be recommended for use on a larger scale in pig production.

Conclusion

Summing up, our data clearly demonstrate that the combine supplementation of piglets during pre-weaning period with a small amount of intramuscularly injected FeDex and orally given hemoglobin (up to day 45 after birth) is a procedure that warrants further normal growth performance of animals up to slaughter as well as assures high quality of pork. Even though this split supplementation does not fully rebalance RBC and iron status of piglets at weaning, it paves the way for normal pig development under standard iron feeding conditions (from birth until the weaning and at the end of fattening). We postulate that exclusive oral supplementation of suckling piglets with highly available heme iron supplements (even without small amount of intramuscularly injected FeDex) is worth considering for pig breeders. Despite its poorer efficiency in rectifying iron status at weaning compared with classical supplementation with FeDex. We believe that elimination of the supplementation of piglets with FeDex injected intramuscularly will allow to avoid several inconveniences of this routine procedure such as invasiveness, pain, and high labor consumption.

Funding Information This work was supported by The National Science Centre, Poland, grant no. 2017/25/B/NZ9/01707 and KNOW- Leading National Research Centre, Scientific Consortium “Healthy Animal – Safe Food”, grant no. KNOW/IGHZ/RMK/PhD/2016/01.

Compliance with Ethical Standards The experimental procedures used in this study were in compliance with the EU guidelines for the care and handling of research animals (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). According to Polish legislation, tests on animals using feed additives and supplements (including iron supplements such as $FeSO_4$, hemoglobin, dried erythrocytes, plasma, blood) are not considered research procedures and therefore do not interfere with animal welfare. Therefore, ethical permission is not required.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Szudzik M, Starzyński RR, Jończy A, Mazgaj R, Lenartowicz M, Lipiński P (2018) Iron supplementation in suckling piglets: an ostensibly easy therapy of neonatal iron deficiency anemia. *Pharmaceuticals* (Basel) 11(4):128
2. Svoboda M, Drabek J (2005) Iron deficiency in suckling piglets: etiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Veterinaria* 49:104–111
3. Svoboda M, Piskova K (2018) Oral iron administration in suckling piglets – a review. *Acta Vet Brno* 87:77–83
4. Lipiński P, Styś A, Starzyński RR (2013) Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell Mol Life Sci* 70(1):23–38
5. Pond WG, Lowrey S, Maner JH, Loosli JK (1961) Parenteral iron administration to sows during gestation or lactation. *J Anim Sci* 20(4):747–750
6. Chaney CH, Barnhart CE (1963) Effect if iron supplementation of sow rations on the prevention of baby pig anemia. *J Nutr* 81:187–192
7. Csapo JE (1996) Proteins, fat vitamins and mineral concentration in porcine colostrum and milk from parturition to 60 days. *Int Dairy J* 6:881–902
8. Lipiński P, Starzyński RR, Canonne-Hergaux F, Tudek B, Oliński R, Kowalczyk P et al (2010) Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am J Pathol* 177:1233–1243
9. Egeli AK, Framstad T (1999) An evaluation of iron-dextran supplementation in piglets administered by injection on the first, third or fourth day after birth. *Res Vet Sci* 66(3):179–184
10. Kleinbeck SN, McGlone JJ (1999) Intensive indoor versus outdoor swine production systems: genotype and supplemental iron effects on blood hemoglobin and selected immune measures in young pigs. *J Anim Sci* 77(9):2384–2390
11. Rincker MJ, Clarke SL, Eisenstein RS, Link JE, Hill GM (2005) Effects of iron supplementation on binding activity of iron regulatory proteins and the subsequent effect on growth performance and indices of hematological and mineral status of young pigs. *J Anim Sci* 83:2137–2145
12. Staroń R, Van Swelm RP, Lipiński P, Gajowiak A, Lenartowicz M, Bednarz A et al (2015) Urinary hepcidin levels in iron-deficient and iron-supplemented piglets correlate with hepcidin hepatic mRNA and serum levels and with body iron status. *PLoS One* 10(8):e0136695
13. Starzyński RR, Laarakkers CM, Tjalsma H, Swinkels DW, Pieszka M, Styś A et al (2013) Iron supplementation in suckling piglets: how to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *PLoS One* 8(5):e64022
14. Ganz T, Nemeth E (2011) Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 62:347–360
15. Nemeth E, Ganz T (2006) Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* 26:323–342
16. Gonzalez-Rosendo G, Polo J, Rodriguez-Jerez JJ, Puga-Diaz R, Reyes-Navarrete EG, Quintero-Gutierrez AG (2010) Bioavailability of a heme-iron concentrate product added to chocolate biscuit filling in adolescent girls living in a rural area of Mexico. *J Food Sci* 75:73–78
17. Young MF, Griffin I, Pressman E, McIntyre AW, Cooper E, McNanley T, Harris ZL, Westerman M, O'Brien KO (2010) Utilization of iron from an animal-based iron source is greater than that of ferrous sulfate in pregnant and nonpregnant women. *J Nutr* 140:2162–2166
18. Young MF, Griffin I, Pressman E, McIntyre AW, Cooper E, McNanley T, Harris ZL, Westerman M, O'Brien KO (2012) Maternal hepcidin is associated with placental transfer of iron derived from dietary heme and nonheme sources. *J Nutr* 142:33–39
19. Weintraub LR, Weinstein MB, Huser HJ, Rafal S (1968) Absorption of hemoglobin iron: the role of a heme-splitting substance in the intestinal mucosa. *J Clin Invest* 47(3):531–539
20. Antileo R, Figueroa J, Valenzuela C (2016) Characterization of a novel encapsulated oral iron supplement to prevent iron deficiency anemia in neonatal piglets. *J Anim Sci* 94:157–160
21. Quintero-Gutierrez AG, Gonzalez-Rosendo G, Sanchez-Munoz J, Polo-Pozo J, Rodriguez-Jerez JJ (2008) Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int J Biol Sci* 4:58
22. Staroń R, Lipiński P, Lenartowicz M, Bednarz A, Gajowiak A, Smuda E, Krzeptowski W, Pieszka M, Korolonek T, Hamza I, Swinkels DW, Van Swelm RPL, Starzyński RR (2017) Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS One* 12(7):e0181117
23. Cebulska A, Kapelański W, Frączek K (2012) Breeding and production of pigs in Poland. *Research in Pig Breeding* 6(1):13–16
24. Borzuta K, Strzelecki J, Dziadek K, Grzeskowiak E, Lisiak D, Janiszewski P (2008) Analiza porównawcza wartości rzeźnej i jakości mięsa świń Hybrydizowanych linii Pen-ar-lan oraz 990. *Roczniki Naukowe Zootechniki* 35(1):63–73
25. Torrance JD, Bothwell TH (1980) Tissue iron stores. *Methods in Hematology* 1:90–115
26. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM (1995) Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 269(2):648–655
27. Laarakkers CMM, Wiegand ET, Klaver S, Kolodziejczyk M, Gille H, Hohlbaum AH, Tjalsma H, Swinkels DW (2013) Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: detection and characterization of a novel hepcidin isoform. *PLoS One* 8: e75518
28. Różycki M (1996) Zasady postępowania przy ocenie świń w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (Principles of pig evaluation in Polish pig testing stations) W: Stan hodowli i wyniki oceny świń (In: Current situation in breeding and evaluation of pigs). Instytut Zootechniki Kraków (National Research Institute for Animal Production, Cracow) 14:69–82
29. Borzuta K (1998) Badania nad przydatnością różnych metod szacowania mięsności do klasyfikacji tusz wieprzowych w systemie EUROP (Studies on usefulness of different methods of meatiness evaluation for the classification of porcine carcasses in the EUROP system). In Polish, summary in English. *Roczniki Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego* 35(2):1–83
30. Pedersen S, Saeed I, Friis H, Michaelsen K (2001) Effect of iron deficiency on *Trichuris suis* and 2 *Ascaris suum* infections in pigs. *Parasitology* 122(5):589–598
31. Perri AM, Friendship RM, Harding JSC et al (2016) An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on post-weaning performance. *Journal of Swine Health and Production* 24(1):10–20
32. Thorn CE (2010) Hematology of the pig. In: Feldman BF, Zinkl JG and Jain NC, Eds., *Schalm's veterinary hematology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 109:843–850

33. Blachier F, Vaugelade P, Robert V, Kibangou B, Canonne-Hergaux F, Delpal S, Bureau F, Blottière H, Bouglé D (2007) Comparative capacities of the pig colon and duodenum for luminal iron absorption. *Can J Physiol Pharmacol* 85(2):185–192
34. Bhattarai S, Nielsen JP (2015) Early indicators of iron deficiency in large piglets at weaning. *Journal of Swine Health and Production* 23:10–17
35. Egeli AK, Framstad T, Morberg H (1998) Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Vet Scand* 39:381–393
36. Friendship RM, Lumsden JH, McMillan I, Wilson MR (1984) Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. *Canadian Journal of Rural Medicine* 48:390–393
37. Perri AM, O'Sullivan TL, Harding JCS, Wood RD, Friendship RM (2017) Hematology and biochemistry reference intervals for Ontario commercial nursing pigs close to the time of weaning. *The Canadian Veterinary Journal* 58(4):371–376
38. Ventrella D, Dondi F, Barone F, Serafini F, Elmi A, Giunti M, Romagnoli N, Forni M, and Bacci M.L (2016) The biomedical piglet: establishing reference intervals for haematology and clinical chemistry parameters of two age groups with and without iron supplementation. *BMC Vet Res* 13:23
39. Muckenthaler M, Rivella S, Hentze MW, Galy B (2017) A red carpet for iron metabolism. *Cell* 168(3):344–361
40. Michalska G, Nowachowicz J, Bucek T, Wasilewski P.D (2006) Wyniki oceny przyżyciowej knurków mieszańców linii 990 i rasy Pietrain różniących się tempem wzrostu. *Zeszyty Naukowe* nr 248 – Zootechnika 36:93–98
41. Michalska G, Nowachowicz J, Chojnacki Z, Bucek T, Wasilewski P.D. (2004). Analysis of the results of performance tested young crossbred boars. *Ann Anim Sci* 2:49–53
42. Różycki M, Dziadek K (2012) Utworzenie i wykorzystanie linii świń 990 do produkcji tuczników. *Wiadomości Zootechniczne* 3: 27–36
43. (NRC) (1998) Nutrient requirements of swine. *National Research Council* (10th ed.). The National Academies Press, Washington, DC
44. (NRC) (2012) Nutrient requirements of swine *National Research Council*, 11th edn. The National Academies Press, Washington, DC
45. Apple JK, Wallis-Phelps WA, Maxwell CV, Rakes LK, Sawyer JT, Hutchison S, Fakle TM (2006) Effect of supplemental iron on finishing swine performance, carcass characteristics, and pork quality during retail display. *J Anim Sci* 85(3):737–745
46. Zhuo Z, Yu X, Li S, Fang S, Feng J (2018) Heme and non-heme Iron on growth performances, blood parameters, tissue mineral concentration and intestinal morphology of weanling pigs. *Biol Trace Elem Res* 187(2):411–417
47. Blicharski T, Ptak J, Hammermeister A, Snopkiewicz M (2014) 2003 do 2014 – Wyniki oceny trzody chlewnej. *Wyd PZHPTCh „POLSUS”*
48. Olsson V, Pickova J (2005) The influence of production systems on meat quality, with emphasis on pork. *Ambio* 34(4):338–343
49. Borzuta K, Lisiak D (2016) Ewolucja wartości rzeźnej trzody chlewnej w Polsce w ostatnim sześćdziesięcioleciu. *Przegląd hodowlany* 4(2016):1–5

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

A3. Innovative Oral Sucrosomial Ferric Pyrophosphate-based Supplementation Rescues Suckling Piglets From Iron Deficiency Anemia Similarly To Commonly Used Parenteral Therapy With Iron Dextran

Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran.

Mateusz Szudzik¹, Rafał Mazgaj¹, Paweł Lipiński¹, Robert Staroń¹, Aneta Jończy¹, Marek Pieszka², Małgorzata Lenartowicz⁴, Aleksandra Bednarz⁴, Marian Kamyczek³, Coby Laarakkers^{5,6}, Dorine Swinkels^{5,6}, and Rafał R. Starzyński¹

¹Institute of Genetics and Animal Breeding PAS, Department of Molecular Biology, Jastrzębiec, Poland;

²Department of Animal Nutrition & Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Kraków, Poland

³Pig Hybridization Centre, National Research Institute of Animal Production, Pawłowice, Poland

⁴Department of Genetics and Evolution, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Kraków, Poland.

⁵Department of Laboratory Medicine (TLM 830), Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

⁶Hepcidinanalysis.com., Nijmegen, The Netherlands.

*Corresponding authors:

Dr. Rafał R. Starzyński r.starzynski@ighz.pl

Dr. Paweł Lipiński p.lipinski@ighz.pl

Institute of Genetics and Animal Breeding PAS

ul. Postępu 36a, 05-552 Magdalenka, POLAND, Phone: +48227367054

This work was supported by grant KNOW/IGHZ/RPB/WEW/2016/09 from the KNOW - Leading National Research Centre, Scientific Consortium “Healthy Animal – Safe Food” and by The National Science Centre, Poland, no. 2017/25/B/NZ9/01707

Short title: SFP prevents neonatal iron deficiency anemia in pigs

Abstract

Iron deficiency is the most common mammalian nutritional deficiency during the neonatal period. However, among mammalian species neonatal iron deficiency anemia (IDA), the most severe consequence of iron scarcity, occurs regularly in pigs. Although intramuscular supplementation of piglets with high amounts of iron dextran (FeDex) is largely considered an appropriate preventive therapy for IDA prophylaxis, an increasing evidence shows that it negatively affects pig physiology. The aim of our study was to evaluate the efficacy of non-invasive supplementation of piglets with sucrosomial ferric pyrophosphate (SFP), a highly bioavailable dietary iron supplement in preventing IDA, in humans and mice. Results of our study show that SFP given to piglets *per os* in the amount of 6 mg Fe daily efficiently counteracts IDA at a rate comparable with the traditional FeDex-based supplementation (100 mgFe/kg b.w.; i.m. injection). This was indicated by physiological values of red blood cell indices and plasma iron parameters measured in 28-day old piglets. Moreover, SFP-supplemented piglets showed significantly lower ($P \leq 0.05$) plasma level of 8-isoprostane, a biomarker for oxidative stress compared to FeDex-treated animals, implying lesser toxicity of this order of iron replenishment. Finally, supplementation with SFP does not increase considerably the blood plasma hepcidin, a peptide that acts to inhibit iron absorption from the diet. SFP emerges as a promising nutritional iron supplement, with a high potential to be adopted in the postnatal period.

Key words: sucrosomial iron, , iron deficiency anemia, piglets

Iron deficiency anemia (IDA) is the most prevalent micronutrient deficiency disorder in suckling piglets of high performance pig (*Sus scrofa domestica*) breeds (Svoboda and Drabek, 2005; Kim et al., 2017; Szudzik et al., 2018). Selective breeding of domestic pigs has been used to control desirable reproduction and growth traits of newborn piglets for centuries (Rubin et al., 2012). It seems therefore, that both high litter size and daily gain in body weight (connected with the increase in blood volume and number of red blood cells) delineate in piglets an unattainable physiological standard for iron demands and thus are among major etiological factors in pig IDA (Svoboda and Drabek, 2005; Kim et al., 2017; Szudzik et al., 2018). Early supplementation of iron to piglets (on days 3-6 postpartum) by the intramuscular injection of large amounts (100 Fe mg/kg b.w or 200 mg Fe per piglet on day 3 after birth) of iron dextran (FeDex) is the most frequent way to prevent the development of IDA in piglets (Egeli and Framstadt, 1999). Although this treatment has an undeniable potential to sustain iron balance and provide sufficient amount of this microelement for erythropoietic needs, it may induce harmful reactive oxygen species. It may also incidentally induce sudden cardiovascular collapse and respiratory failure, caused by fatal anaphylaxis leading to asphyxia and hypotension (Ueberschär, 1966). Alternatively, oral iron supplementation in piglets with iron salts and chelates seems to be relatively inefficient (Szabo and Bilkei, 2002; Egeli and Framstad, 1998; Svoboda and Pistkova, 2018) except when applied in very high amounts (Maes et al. 2011), mainly because inorganic iron displays low bioavailability and molecular mechanisms of iron absorption in newborn animals are immature (Lipiński et al., 2010).

Sucrosomial® Iron is an innovative sucrosomial ferric pyrophosphate (SFP) supplement containing phospholipids and sucrose esters of fatty acids assuring its high bioavailability and tolerability (Pisani et al., 2015; Gómez-Ramírez et al., 2018). The efficacy of SFP in correcting iron deficiency

attested by the restoration of physiological hemoglobin levels has been proven in human and animal studies (Giordano et al., 2015; Parisi et al., 2017). Here, we show that SFP given orally to suckling piglets is a suitable feed additive for the reinforcement of iron status in piglets in the critical period from birth to weaning. Compared to parental FeDex, oral supplementation with SFP is not only as effective but also resulted in lower levels of the oxidative stress biomarker 8-isoprostane. To our knowledge, this study provides first demonstration of successful preventive/therapeutic use of SFP in mammalian neonates. This suggests that, iron contained in SFP can be efficiently transported across the intestinal barrier and become bioavailable despite immaturity of molecular mechanisms of iron absorption due to its specific chemical formula.

Materials and methods

Ethical statement

The experimental procedures used in this study were in compliance with the EU guidelines for the care and handling of research animals (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). Second Local Ethical Committee on Animal Testing at the Warsaw University of Life Sciences in Warsaw granted a formal waiver of the ethical approval because the only procedure involved in the study was euthanasia and intramuscular injection of FeDex to piglets is a routine veterinary procedure. Moreover, administration of a dietary supplement such as sucrosomial ferric pyrophosphate is not considered a research procedure.

Piglets, experimental design and biological sample collection

Experiment was conducted at the Pig Hybridization Centre in Pawłowice belonging to the National Research Institute of Animal Production (Balice, Poland). A total of 18 Polish Landrace piglets (males) from 6 different litters housed in standard conditions (70% humidity and a temperature of 22°C in cages with straw bedding) were used. During the experiment sows were allowed to nurse their piglets and piglets had no access to the sows' feed. The Prestarter Wigor 1 Plus feed (containing 238 mg Fe per 1 kg as estimated by flame air-acetylene AAS using PerkinElmer Life Sciences 1100B,

MA, USA instrument at 248.3 nm) was offered to piglets from day 5 to day 28 after birth. The composition and nutritive value of Prestarter Wigor 1 Plus is shown in Supplementary Table 1. Piglets from 6 different litters were randomly allotted to 2 experimental groups on the basis of balanced body weight and equalized red blood cell indices at day 3 after birth. Each litter provided piglets for two experimental groups. Other piglets from the litter not selected for experiment did not participate in them but remained with their mothers. First group of piglets (n=9; FeDex) received parenteral iron supplementation (Ferran[®]100, Vet-Agro, Lublin, Poland, Fe 3⁺100 mg/ml; 100 Fe mg/kg BW) on the third day of life, by intramuscular injections of FeDex in the neck. This routinely applied iron supplement is a complex of ferric ions with low molecular weight dextran. The second group of piglets (n=9; SFP) received oral iron supplementation (Sucrosomial[®] iron; (PharmaNutra, Pisa, Italy, INGREDIENTS: - Ferro Sucrosomiale[®] (iron pyrophosphate – 6 mg of Fe/g of powder, pregelatinised rice starch, saccharic esters of fatty acids, sunflower lecithin supported on glucose syrup, milk proteins, tricalcium phosphate) in a daily dose of 6 mg/kg BW from day 5 to 28 of life. SFP powder was suspended in 2 ml of milk replacer (application with a sterile syringe). Sucrosomial ferric pyrophosphate (SFP) represents an innovative oral iron-containing carrier in which ferric pyrophosphate is protected by a phospholipid bilayer membrane mainly from sunflower lecithin and sucrose matrix (Gómez-Ramírez et al., 2018). Feed intake was calculated as the intake per litter divided by the number of piglets in the litter. Weighed Prestarter was applied to play feeder[®] troughs (Middelkoop et al., 2019). When the piglet lost interest in fodder, the remaining Prestarter was weighed. Average total Fe intake from creep feed/piglet (mg) has been calculated and shown in Supplementary Table 2. Blood was drawn on day 28 after birth in both experimental groups by venipuncture of the jugular vein (*Vena jugularis externa*) into tubes coated with heparin as an anticoagulant. The blood samples were centrifuged (1200 x g, 10 min, 4°C) to separate the plasma. Plasma samples were immediately aliquoted and stored at -80°C. All experimental piglets were euthanized by the intracardiac injection of 0.5 mL/kg b.w. of Morbital (133.3 mg/mL of sodium pentobarbital + 26.7 mg/mL of pentobarbital, Biowet, Puławy, Poland). Sow's milk was collected at day 21 of lactation. Tissue samples were collected, rinsed with PBS (Phosphate Buffer Saline) and then stored at -80°C until they were used for biochemical analyses.

Measurement of red blood cell indices and plasma iron level

Hematological indices were determined using an automated ADVIA 2010 analyzer (Siemens, Munich, Germany). The plasma iron concentration was determined by colorimetric measurement of an iron-chromazurol complex according to the manufacturer's protocol (Alpha Diagnostic, Poland).

Measurement of 8-isoprostane level

Levels of 8-isoprostane, an oxidative stress marker were measured in plasma, spleen and liver according to the manufacturer's protocol (8 isoprostane ELISA Kit (ab175819), Cambridge Biomedical Campus, UK) (Rajendran et al., 2019; Starzyński et al., 2017).

Measurement of iron content and distribution in tissues

The non-heme iron contents of liver, spleen, kidney, heart, bone marrow and brain (100 mg), as well as milk samples (200 µl) were determined by acid digestion of the samples at 100°C for 10 minutes, followed by colorimetric measurement of the absorbance of the iron-ferrozine complex at 560 nm (Beckman DU®-68 Spectrophotometer, CA, USA) as described previously (Torrance and Bothwell, 1980).

The heme content of formic acid-solubilized tissues was determined spectrophotometrically at 398 nm (Beckman DU®-68 Spectrophotometer, CA, USA) using hemin standards prepared in formic acid and a molar absorption coefficient of $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Motterlini et al., 1995). Non-heme hepatic, splenic and bone marrow iron deposits were analyzed using the Accustain Iron Deposition Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Briefly, liver and spleen samples excised immediately after sacrifice of piglets were fixed in Bouin's solution for 24 h, then stored in 70% ethanol. After embedding in paraffin, the samples were cut into 7-µm sections using a microtome (Reichert-Jung, 2030, Nussloch, Germany). The sections were placed on a slide, deparaffinized and incubated with Perls'

Prussian Blue solution for 30 minutes. Slides were counterstained with pararosaniline solution for 2 minutes and examined with a standard compound light microscope (Olympus, type CH2, Tokyo, Japan). The same procedure of staining with Prussian Blue was performed using bone marrow smears prepared from piglets.

Blood plasma hepcidin-25 quantification

Hepcidin-25 measurements were performed as described previously for porcine plasma samples (Starzyński et al., 2013; Staroń et al., 2015) by a combination of weak cation exchange chromatography and time-of-flight mass spectrometry (WCX-TOF MS) using a stable hepcidin-25+40 isotope as internal standard for quantification. Peptide spectra were generated on a Microflex LT matrix-enhanced laser desorption/ionisation TOF MS platform (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Hepcidin-25 concentrations were expressed as nmol/L (nM). The lower limit of quantification of this method was 0.5 nM. The concentration of pig hepcidin-25 was calculated by comparing its mass peak height with that of the internal standard (Laarakkers et al., 2013).

Statistical analysis

Data normality tests including the Shapiro-Wilk were performed. Results were statistically analyzed with Student's t-test for normal distributed data or Mann-Whitney test for non normal distributed data using GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, (GraphPad Software, USA). $P \leq 0.05$, was considered significant. For the statistical analysis, each individual animal ($n = 18$) was considered as the experimental unit. Data are presented as mean values $\pm$ SEM. All measurements were made in two technical replicates.

Results

Red blood cell indices in piglets supplemented with FeDex and SFP

Oral supplementation of piglets with SFP (daily dose of 6 mg Fe) from day 5 after birth up to weaning resulted in maintenance of values of red blood cell indices of 28-day old animals at physiological levels (Table 1). Importantly, hemoglobin concentration in these piglets (8.8 ± 1.64 g/dL) was above the threshold value for anemia in pigs, i.e. 8 g/dL (Egeli et al., 1998a). In piglets receiving SFP, values of all hematological parameters were similar (showed no statistically significant differences) to those evaluated in animals given parenteral injection with FeDex, i.e. supplementation considered as highly efficient in preventing the occurrence of IDA and commonly used in pig rearing (Egeli and Framstad, 1999).

Importantly for pig farming and future fattening, feed intake was measured in both groups of piglets and showed no statistically significant differences (Table 2). All growth performance parameters (Table 2) including daily body weight gain (from the 1st to the 28th day after birth), initial and final body weight and tissue weight (Table 2) of 28-day old piglets receiving SFP *per os* were similar to those of animals given FeDex injections. Iron content in sow's milk were similar (Table 2) and very low compared with creep feed offered to piglets during experiment (Supplementary Table 1).

Blood plasma iron levels and tissue iron content and distribution in piglets supplemented with FeDex and SFP

To compare iron status of piglets from both experimental groups, we performed a comprehensive analysis of iron content in their tissues including the measurement of iron concentration in blood plasma, non-heme and heme iron content in liver, spleen, kidney, heart and brain (Table 4). Considering that liver, spleen and bone marrow are key organs for maintaining systemic iron balance, in addition, we analyzed the distribution of non-heme iron deposits in these tissues by staining with Perls' Prussian Blue (Figure 1). We found that plasma iron levels in piglets supplemented with SFP were almost 2-fold higher compared with FeDex-treated animals ($P < 0.05$) (Table 4), which attests high

nutritional bioavailability of SFP-derived iron and denotes adequate iron provision for piglets erythropoietic demand. In contrast to FeDex-derived iron, iron absorbed from oral supplement is not preferentially stored in the liver as evaluated by biochemical analysis of non-heme (Table 4) and histological analysis of iron deposit (Figure 1). Interestingly, supplementation of piglets with SFP resulted in significantly lower non-heme iron loading of the bone marrow compared to piglets receiving FeDex ($P<0.05$) (Figure 1). However, using Prussian Blue staining of bone marrow smears we failed to detect any iron deposits in samples from both SFP and FeDex supplemented piglets (Figure 1). In other tissues analyzed for iron content such as spleen, heart, brain, and kidney we detected no significant differences in non-heme iron level between SFP- and FeDex-supplemented animals (Table 4). Regarding tissue heme iron, its levels, regardless of the tissue, did not differ between piglets from two experimental groups (Table 3).

Blood plasma and hepatic 8-isoprostane levels in piglets supplemented with FeDex and SFP

Application of supplemental iron to suckling piglets raises questions about the toxic effects of exposure to high iron levels at an early age. Considering that excess iron induces reactive oxygen species, we determined in 28-day old piglets from both experimental groups blood plasma and hepatic levels of 8-isoprostane, a biomarker providing a reliable measure of oxidative stress (Tsikas and Suchy, 2016). We found that in plasma of SFP-supplemented piglets, 8-isoprostane level were only half that of measured in FeDex-treated animals (Table 4). In the liver of piglets receiving *per os* SFP we also observed decreased 8-isoprostane concentration, although this decline was not statistically significant. We did not observe a decrease in 8-isoprostane level in the spleen (Table 4).

Concentration of hepcidin-25 in the blood plasma of piglets supplemented with FeDex and SFP

Analysis of hepcidin level is helpful for guiding safe iron supplementation in piglets. Here, we found that the concentration of hepcidin-25 in heparin-treated plasma of piglets supplemented orally with SFP and parenterally with FeDex was not detectable in any of the samples (below the lower limit of detection, i.e. 0.5 nM).

Discussion

In most mammals reserves of iron accumulated in the liver during gestation are primary source of this microelement in early postnatal life. However, in piglets hepatic iron stores are relatively low and are rapidly exhausted during few days after birth (Peters and Mahan, 2008; Lipiński et al., 2010). Our previous data indicated that between day 1 and 3 postpartum in the Polish Landrace piglets iron content in the liver is drastically decreased to a barely detectable level (Lipiński et al., 2010). For this reason, exogenous iron fortification is crucial to prevent and treat iron deficiency in piglets. Intramuscular bolus injection of high amounts of iron in the form of FeDex to piglets, has emerged as an efficient technique to counteracting iron deficiency in pig breeding (Egeli and Framstad, 1999; Svoboda and Drabek, 2005; Szudzik et al., 2018). Interestingly, dietary supplements are usually much less effective (Egeli and Framstad, 1998; Szabo and Blikei, 2002; Svoboda and Pistkova, 2018), unless iron is given in excessive (grams) quantities (Maes et al., 2011).

Iron absorption is a tightly regulated process, in which several iron transporters, oxidoreductases, and regulatory proteins act in concert to transfer adequate amount of dietary iron successively across the apical and basolateral membrane of duodenal enterocytes (Gulec et al., 2014). Poor responsiveness of suckling piglets during the neonatal period to orally administered iron salts and chelates is caused by impaired molecular mechanisms of iron absorption, i.e. very low expression of the main iron transporters in the duodenum (Lipiński et al., 2010). It seems that immaturity of molecular absorption machinery is a common developmental insufficiency in mammalian neonates as demonstrated in mice, rats and humans (reviewed in Lipiński et al., 2013). Nevertheless, the oral route of iron ad-

ministration to piglets remains potentially an attractive procedure as it is noninvasive and enables accurate, gradual iron dosing during consecutive days of supplementation.

Liposomes (small vesicles enclosed by a lipid bilayer membrane) are now well recognized and widely used delivery carriers for drugs that can reduce systemic toxicity and increase drug delivery to the target sites in the body (Alavi et al., 2017). Importantly for this study, iron compounds encapsulated in liposomes have been successfully used to relieve the iron deficiency in various animal models (Zimmermann, 2004). Here, we made an attempt to verify efficacy of SFP, liposomal iron preparation to rescue piglets from neonatal IDA. A strong indication for using SFP in the treatment of neonatal IDA in pig model was that its liposomal formulation allows transfer of iron (III) pyrophosphate encapsulated in liposomes across the duodenal barrier independently of established molecular pathways of iron absorption (Rodriguez et al., 2019; Pisani et al., 2015; Mazgaj et al., 2020). Furthermore, sucrose ester has the dual function of protecting the iron from stomach acid while interacting with the absorptive enterocytes. Preventive/curative effect of piglets supplementation with SFP, was evaluated in comparison with the parenteral treatment of piglets with FeDex, a procedure with proven efficacy which is widely used in pig rearing (Egeli et al., 1999). In both groups of animals all analyzed RBC indices were similar and perfectly within the physiological range established for this age group of pigs (Egeli et al., 1998a). RBC count was insignificantly higher in piglets given SFP. Importantly, physiological RBC status of piglets receiving SFP was accompanied by the normal growth performance as their body weight gain during the first 4 weeks of life met the growth standards for the Polish Landrace breed and was higher than in anemic piglets (Staroń et al., 2017). Our results prove that the amount and bioavailability of iron provided with SFP is adequate for meeting erythropoietic needs of suckling piglets.

It is worth noting that the appearance of first IDA symptoms is usually preceded by the deterioration of systemic iron status. It often happens that while RBC indices remain within standards, hepatic iron stores decline. Therefore, we evaluated body iron content of piglets supplemented with SFP and found that these animals are sufficiently but not excessively replenished with this microelement, compared with FeDex-treated animals. Firstly, we found elevated iron level in blood plasma, which is

a source of iron for erythropoiesis as it is known that diferric transferrin in the blood plasma is the major molecule providing iron for erythroid heme synthesis (Papanikolaou and Pantopoulos, 2017). Secondly, higher (but not significant) iron content detected in the spleen may reflect its contribution to erythropoietic activity. Accordingly, spleen is one of the extramarrow soft tissues that produce red blood cells (Orphanidou-Vlachou et al., 2014). Lower hepatic iron content in piglets supplemented with SFP compared with those given FeDex may be due to the fact that after intramuscular injection of FeDex to animals, it enters the reticuloendothelial cells in the liver through lymphatic circulation and thus contributes to the excessive iron accumulation in this tissue (Geisser et al., 1992). Indeed, in our studies (Lipiński et al., 2010; Staroń et al., 2015; Starzyński et al., 2013; present study) we constantly observed increased deposits of non-heme iron in hepatic macrophages (Browicz-Kupffer cells) after supplementation of piglets with FeDex. Saving reticuloendothelial macrophages from iron overload may be an advantage of SFP-based supplementation as high iron level in hepatic macrophages may contribute to the induction of hepcidin expression (Rausa et al., 2015), a peptide that inhibits absorption of inorganic iron through canonical molecular mechanisms (Lipiński et al., 2010; Staroń et al., 2015; Staroń et al., 2017). Hepcidin is an iron-regulatory hormone synthesized mainly by hepatocytes and secreted into the circulation as a 25 aa peptide. It acts as a negative regulator of iron absorption from the duodenum and iron release from macrophages recycling old red blood cells and thus adjusts iron supplies to body as per iron requirements (Muckenthaler et al., 2017). Animals supplemented with SFP showed no evidence of increased blood plasma hepcidin concentration, which was below the lower limit of detection, i.e. 0.5 nM. The expression of hepcidin is induced transcriptionally mainly in response to iron. There is experimental evidence that both hepatic iron loading (Pigeon et al., 2001) and high saturation of plasma transferrin with iron (Lin et al., 2007) stimulate hepcidin synthesis. We hypothesize that in piglets supplemented with SFP neither transferrin saturation nor hepatic iron level reached a threshold that could have induced hepcidin. Interestingly, we also found a very low blood plasma hepcidin level (below 0.5 nM) in FeDex-treated animals. By contrast, hepcidin-25 concentration was strongly elevated in the plasma of 28-day old piglets subjected to the procedure of 2-fold FeDex injection on days 3 and 21 after birth used in our previous studies (Starzyński et al., 2013; Staroń et al., 2015; Staroń et al., 2017).

According to the double-edge sword nature of iron, this biometal, apart from being an essential micronutrient, is potentially toxic due to its redox properties leading to the generation of highly toxic reactive oxygen species. In this context, evaluation of any iron supplementation procedure must involve an assessment of its toxic effects. Administration of iron to piglets in the form of FeDex carries a risk of oversupplementation. During this procedure, piglets usually receive in a bolus injection an amount of iron, which exceeds 4-5 times the total content of this element in their body. Consequently, only a part of supplemental iron may be used for physiological purposes. The remaining part may be potentially toxic. We have previously demonstrated that supplementation of piglets with FeDex induces oxidative damage to DNA in the liver (Lipiński et al., 2010). In this study, despite using lower dose of FeDex, piglets receiving this treatment showed the plasma concentration of 8-isoprostane, a popular lipid peroxidation marker (Tsikas and Suchy, 2014) at level almost twice as high as animals supplemented with SFP. As 8-isoprostane found in blood plasma originates from lipid membranes in any tissue of the piglet's body, its plasma levels furnishes a systematic and integrated evaluation of oxidative stress in the whole organism. Our results indicate considerably reduced levels of oxidative stress in piglets fed with SFP compared to animals injected with FeDex. It is noteworthy that the total amount of supplemental iron given per piglet from each experimental groups is higher in FeDex group than in SFP group (~200 *versus* 138 mg). Although we cannot calculate the exact amount of iron absorbed by piglets from SFP, our observation showing that the content of iron in feces of piglets from both group is similar (FeDex 0.645 vs. SFP 0.747 mg/kg feces) This suggests that the major part of iron applied orally with SFP is absorbed by piglets. Moreover, our time consuming procedure of individual SFP application to animals may be justified by the fact that we wanted to strictly control the amount of supplemental iron. Such control is indispensable when testing for the first time a new iron supplement. Previously, we have tested the efficacy of heme iron in prophylaxis of IDA in piglets by adding powdered hemoglobin directly to the feed (Staroń et al., 2017). We hypothesize that conducting a large-scale experiment using SFP will reveal the utility of this supplement to prevent IDA in pigs rearing/farming

Conclusion

We conclude that oral supplementation of suckling piglets with sucrosomial ferric pyrophosphate during a period of 23 consecutive days, resulted in similar therapeutic effect and caused decreased toxicity of supplemental iron compared to the procedure of iron dextran injection on day 3 after birth. In this context, supplementation with sucrosomial ferric pyrophosphate appears a promising procedure that can be applied for the correction of iron deficiency anemia in suckling piglets. However, the detailed about molecular mechanisms of sucrosomial ferric pyrophosphate absorption in piglets after *per os* application remains to be elucidated. Appropriate studies in this direction are currently being carried out in our laboratory.

References

- Alavi M., Karimi N., Safaei M. (2017). Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. *Adv. Pharm. Bull.*, 7: 3-9.
- Egeli A.K., Framstad T. (1998a). Evaluation of the efficacy of perorally administered glutamic acid chelated iron and iron-dextran injected subcutaneously in Duroc and Norwegian Landrace piglets. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 45: 53–61.
- Egeli A.K., Framstad, T., Morberg H. (1998b). Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta. Vet. Scand.*, 39: 381–393.
- Egeli A.K., Framstad T. (1999). An evaluation of iron-dextran supplementation in piglets administered by injection on the first, third or fourth day after birth. *Res Vet Sci.*, 66: 179–184.
- Geisser P., Baer, M., Schaub E. (1992). Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations. *Arzneimittelforschung.*, 42: 1439–1452.
- Giordano G., Mondello P., Tambaro R., Perrotta N., D'Amico F., D'Aveta A., Berardi G., Patriarca A., Corbi G.M., Di Marzio L., Licianci A., Berardi D, Di Lullo L., Di Marco R. (2015). Biosimilar epoetin α is as effective as originator epoetin- α

- plus liposomal iron (Sideral®), vitamin B12 and folates in patients with refractory anemia: A retrospective real-life approach. *Mol. Clin. Oncol.*, 3: 781-784.
- Gómez-Ramírez S., Brilli E., Tarantino G., Muñoz M. (2018). Sucrosomial® Iron: A New Generation Iron for Improving Oral Supplementation. *Pharmaceuticals (Basel)*, 11: 97.
- Gulec S., Anderson G.J., Collins J.F. (2014). Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 15: 397-409.
- GraphPad Software Inc, (2018). Prism, Version 8.0.1. Retrieved on August 5th, 2019 from <http://www.graphpad.com>.
- Kim J.C., Wilcock P., Bedford M.R. (2018). Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: a review. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 235: 8-14.
- Laarakkers C.M.M., Wiegerinck E.T., Klaver S., Kolodziejczyk M., Gille H., Hohlbaum A.H., Tjalsma H., Swinkels D.W. (2013). Improved mass spectrometry assay for plasma hepcidin: Detection and characterization of a novel hepcidin isoform. *Plos One.*, 8: e75518.
- Lin L., Valore E.V., Nemeth E., Goodnough J.B., Gabayan V., Ganz T. (2007). Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood.*, 15: 2182–2189.
- Lipiński P., Starzyński R.R., Canonne-Hergaux F., Tudek B., Oliński R., Kowalczyk P., Dziaman T., Thibaudeau O., Gralak M.A., Smuda E., Woliński J., Usińska A., Zabielski, R. (2010). Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am. J. Pathol.*, 177: 1233–43.
- Lipiński P., Styś A., Starzyński R.R. (2012). Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 70: 23–38.

- Maes D., Steyaert M., Vanderhaeghe C., López-Rodríguez A., de Jong E., Del Pozo Sacristán R., Vangroenweghe F., Dewulf J. (2011). Comparison of oral versus parenteral iron supplementation on the health and productivity of piglets. *Vet. Rec.*, 168: 188.
- Mazgaj R., Szudzik M., Lipiński P., Jończy A., Smuda E., Kamyczek M., Cieślak B., Swinkels D., Lenartowicz M., and Starzyński R.R. (2020). Effect of Oral Supplementation of Healthy Pregnant Sows with Sucrosomial Ferric Pyrophosphate on Maternal Iron Status and Hepatic Iron Stores in Newborn Piglets. *Animals (Basel)*, 10 :1113.
- Middelkoop A., Costermans N., Kemp B., Bolhuis J.E. (2019). Feed intake of the sow and playful creep feeding of piglets influence piglet behaviour and performance before and after weaning. *Sci. Rep.*, 16: 140.
- Motterlini R., Foresti R., Vandegriff K., Intaglietta M. (1995) Winslow RM. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am. Physiol. Soc.*, 269: 648-655.
- Muckenthaler M., Rivella S., Hentze M.W., Galy B. (2017). A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell.*, 168: 344-361.
- Orphanidou-Vlachou E., Tziakouri-Shiakalli C., Georgiades C.S. (2014). Extramedullary hemopoiesis. *Semin. Ultrasound CT.*, 35: 255-262.
- Papanikolaou G., Pantopoulos K. (2017). Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life.*, 69: 399-413.
- Parisi F., Berti C., Mandò C., Martinelli A., Mazzali C. (2017). Cetin I. Effects of different regimens of iron prophylaxis on maternal iron status and pregnancy outcome: a randomized control trial. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 30: 1787-1792.
- Peters J.C., Mahan D.C. (2008). Effects of neonatal iron status, iron injections at birth, and weaning in young pigs from sows fed either organic or inorganic trace minerals. *J. Anim. Sci.*, 86: 2261–2269.

- Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., Leroyer P., Turlin B., Brissot P., et al. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.*, 16: 7811-7819.
- Pisani A., Riccio E., Sabbatini M., Andreucci A., Del Rio A., Visciano B. (2015). Effect of oral liposomal iron versus intravenous iron for treatment of iron deficiency anaemia in CKD patients: a randomized trial. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 30: 645–652.
- Rajendran J., Purhonen J., Tegelberg S., Smolander O.P., Mörgelin M., Rozman J., Gailus-Durner V., Fuchs H., Hrabe de Angelis M., Auvinen P., Mervaala E., Jacobs H.T., Szibor M., Fellman V., Kallijärvi J. (2019). Alternative oxidase-mediated respiration prevents lethal mitochondrial cardiomyopathy. *EMBO Mol Med.*, 11.
- Rausa M., Pagani A., Nai, A., Campanella A., Gilberti M.E., Apostoli P., Camaschella C., Silvestri L. (2015). Bmp6 Expression in Murine Liver Non Parenchymal Cells: A Mechanism to Control their High Iron Exporter Activity and Protect Hepatocytes from Iron Overload? *PLoS One.*, 10: e0122696.
- Rincker M.J., Clarke S.L., Eisenstein R.S., Link J.E., Hill G.M. (2005). Effects of iron supplementation on binding activity of iron regulatory proteins and the subsequent effect on growth performance and indices of hematological and mineral status of young pigs. *J Anim. Sci.*, 83:2137–2145.
- Rodriguez R.B. (2019). Study of M cells role in sucrosomial® iron absorption pathway. 7th International Multidisciplinary Course of Iron Deficiency 2019. 8-9 March, Rome, Italy. 64.
- Rubin C.J., Megens H.J., Martinez-Barrio A., Maqbool K., Sayyab, S., Schwochow D., Wang C., Carlborg Ö., Jern P., Jørgensen C.B., Archibald A.L., Fredholm M., Groenen M.A., Andersson L. (2012). Strong signatures of selection in the domestic pig genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 109: 19529-36.
- Staroń R., Van Swelm R.P., Lipiński P., Gajowiak A., Lenartowicz M., Bednarz A., Pieszka M., Laarakkers C.M., Swinkels D.W., Starzyński R.R. (2015). Urinary

- Hepcidin Levels in Iron-Deficient and Iron-Supplemented Piglets Correlate with Hepcidin Hepatic mRNA and Serum Levels and with Body Iron Status. *PLoS One.*, 10: e0136695.
- Starzyński R.R., Laarakkers C.M., Tjalsma H., Swinkels D.W., Pieszka M., Styś A., Mickiewicz M., Lipiński P. (2013). Iron supplementation in suckling piglets: how to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *PLoS One.*, 8: e64022.
- Starzyński R., Szudzik M., Staroń R., Jończy A., Smuda E., Pieszka M., Kamyczek M., Lipiński P. (2017). Comparison of the therapeutical potential of oral sucrosomial iron and parenteral iron dextran supplementations in neonatal iron deficiency anemia in pigs. *Am. J. Hematol.*, 92: 286–286.
- Svoboda M., Drabek J. (2005). Iron deficiency in suckling piglets: etiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Vet.*, 49: 104–111.
- Svoboda M., Píšťková K. (2018). Oral iron administration in suckling piglets – a review. *Acta Vet. Brno.*, 87: 77-83.
- Szabo P., Bilkei G. (2002). Iron deficiency in outdoor pig production. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 49: 390–391.
- Szudzik M., Starzyński R.R., Jończy A., Mazgaj R., Lenartowicz M., and Lipiński P. (2018). Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia. *Pharmaceuticals (Basel).*, 11: 128.
- Torrance J.D., Bothwell T.H. (1980). Iron stores. *Methods. Hamatol.* 1: 90-115.
- Tsikas D., Suchy M.T. (2016). Protocols for the measurement of the F2-isoprostane, 15(S)-8-isoprostaglandin F2 α , in biological samples by GC-MS or GC-MS/MS coupled with immunoaffinity column chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 15: 191-201.
- Ueberschär S. (1966). Sudden death in suckling piglets following administration of iron-dextran-preparation. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 73: 145–150.

Zimmermann M.B. (2004). The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 74, 453-461.

Tables

Table 1. Comparison of red blood cell indices of piglets supplemented with FeDex^a and SFP^b. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM, (nine male piglets per treatment). ^a Iron dextran. ^b Sucrosomial ferric pyrophosphate; Blood cell indices were determined for piglets from each group on day 28 after birth. ^c Red blood cell count, ($\times 10^6/\mu\text{L}$). ^d Hemoglobin concentration, (g/dL). ^e Hematocrit value (%). ^f Mean corpuscular volume (fL). ^g Red cell distribution width (%). ^h Mean cell hemoglobin (pg).

Parameter	Groups		SEM	<i>P</i>
	FeDex ^a	SFP ^b		
RBC ^c ($\times 10^{12}/\text{L}$)	5.89	6.05	0.207	0.714
HGB ^d (g/dL)	8.90	8.80	0.381	0.517
HCT ^e (fraction)	0.20	0.26.1	1.827	0.535
MCV ^f (fL)	48.85	41.08	1.971	0.245
RDW ^g (%)	37.28	36.30	2.384	0.832
MCH ^h (pg)	14.40	13.54	0.531	0.451

Table 2. Growth performance and sow's milk iron content. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM, (nine male piglets per treatment). ^a Iron dextran. ^b Sucrosomial ferric pyrophosphate. ^c Average daily gain in piglets during the period between days 1 and 28 after birth, (g). ^d Creep feed to gain ratio.

Parameter	Groups		SEM	<i>P</i>
	FeDex ^a	SFP ^b		
Initial BW (kg)	1.89	2.02	0.056	0.971
Final BW (kg)	7.16	7.14	0.210	0.957
Creep feed intake (g/day/piglet)	32.66	33.92	1.270	0.584
ADG ^c (g)	194.97	189.46	7.780	0.947
F:G ratio ^d (kg/kg)	0.16	0.17	0.009	0.949
Sow's milk Fe (μ g/g)	0.33	0.34	0.090	0.990

Table 3. Comparison of different tissues weight in piglets supplemented with FeDex^a and SFP^b. Tissues weight are calculated on 100g of body weight. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM, (nine male piglets per treatment). ^a Iron dextran. ^b Sucrosomial ferric pyrophosphate.

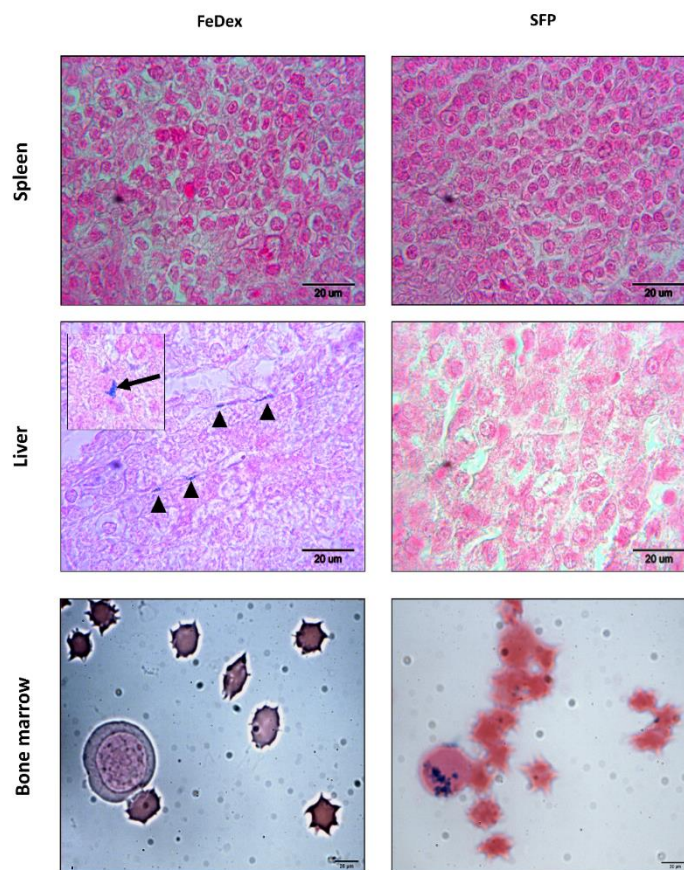
Tissues (g/100 g of body weight)	Groups		SEM	<i>P</i>
	FeDex ^a	SFP ^b		
liver	2.72	2.86	0.180	0.579
kidney	0.30	0.38	0.025	0.106
spleen	0.27	0.27	0.012	0.972

Table 4. Comparison of the tissular non-heme and heme iron content and 8-isoprostane levels in piglets supplemented with FeDex^a and SFP^b. Values are expressed as the means $\pm$ SEM for tissue samples obtained from pigs of each group (nine male piglets per treatment). ^a Iron dextran. ^b Sucrosomial ferric pyrophosphate. ^c Measured in following tissues: plasma, liver, spleen, kidney, heart, brain, bone marrow, (mg Fe/kg of wet tissue). ^d Measured in following tissues: liver, spleen, kidney, heart, brain, (mg Fe/kg of wet tissue). ^e Oxidative stress biomarker level was measured in plasma, liver and spleen, (pg/ml).

Parameter	Tissue	Groups		SEM	<i>P</i>
		FeDex ^a	SFP ^b		
Non heme iron level ^c (mg Fe/kg of wet tissue)	liver	116.55	29.50	14.110	0.001
	spleen	55.66	76.44	7.951	0.205
	kidney	21.00	21.60	4.160	0.868
	heart	35.44	46.88	4.330	0.545
	brain	9.60	8.80	3.010	0.879
	bone marrow	9.20	4.00	1.110	0.008
Heme iron level ^d (mg Fe/kg of wet tissue)	liver	8.66	10.00	0.612	0.300
	spleen	30.33	31.66	1.856	0.609
	kidney	8.33	11.33	1.160	0.214
	heart	8.66	11.16	1.077	0.060
	brain	3.66	3.33	0.420	0.580
8-isoprostane level ^e (pg/ml)	plasma	63.33	39.33	6.600	0.052
	liver	765.66	613.83	58.153	0.090
	spleen	28.67	30.19	1.976	0.723
plasma iron level (μ mol/L)		7.0857	9.3563	1.4128	0.043

Figure caption

Figure 1. Comparison of iron deposits in spleen, bone marrow and liver in piglets supplemented with FeDexa and SFPb. Histological examination of iron loading in liver, spleen and bone marrow. Non-heme iron deposits were detected by staining with Perl's Prussian Blue (blue stain) exclusively in Kupffer cells of piglets supplemented with FeDex (indicated by arrow heads). a Iron dextran. b Sucro-somial ferric pyrophosphate.



B. Oświadczenia współautorów

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych publikacjach jako promotora jego pracy doktorskiej dotyczył w głównej mierze opracowania koncepcji doświadczeń i opieki merytorycznej prowadzonych doświadczeń.

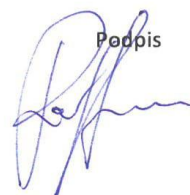
Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Małgorzata Lenartowicz, Paweł Lipiński. (2018). Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia. Pharmaceuticals (Basel). doi:10.3390/ph11040128
2. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
3. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Miejscowość, data

Gorzków
2.08.2020

Podpis



Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Małgorzata Lenartowicz, Paweł Lipiński. (2018). *Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia*. Pharmaceuticals (Basel). doi:10.3390/ph11040128
2. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). *Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs*. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
3. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). *Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran*. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

31.07.2020 Jastymbiec
Miejscowość, data



Prof. dr hab. Paweł Lipiński

Podpis

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Małgorzata Lenartowicz, Paweł Lipiński. (2018). *Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia*. Pharmaceuticals (Basel). doi:10.3390/ph11040128
2. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). *Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs*. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
3. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). *Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran*. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Miejscowość, data

Jastrzębiec, 30.07.2020

dr Aneta Jończy

Podpis

Aneta Jończy

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Małgorzata Lenartowicz, Paweł Lipiński. (2018). *Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia*. Pharmaceuticals (Basel). doi:10.3390/ph11040128
2. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). *Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs*. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
3. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). *Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran*. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

31.07.2020 Jastrzębiec
Miejscowość, data

mgr Rafał Mazgaj

Podpis


Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
2. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Justyna Bieć 3.08.2020
Miejscowość, data

Ewa Smuda
Podpis

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). *Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran*. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Warszawa, 10.08.2020

Miejscowość, data

Robert Staroń

Podpis

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszcza, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
2. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszcza, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Miejscowość, data

Jabłonna, 31.07.2020 r

Podpis:

Marek Pieszcza

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Paweł Lipiński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Marek Pieszka, Marian Kamyczek, Ewa Smuda, Rafał R. Starzyński. (2019). Long-term Effect of Split Iron Dextran/Hemoglobin Supplementation on Erythrocyte and Iron Status, Growth Performance, Carcass Parameters and Meat Quality of Polish Large White and 990 Line Pigs. Biological Trace Element Research. doi.org/10.1007/s12011-019-01950-w
2. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Miejscowość, data

Pawłowice 03.08.2020

Podpis



MARIAN KAMYCZEK

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionych pracach był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tych pracach ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy, Rafał Mazgaj, Małgorzata Lenartowicz, Paweł Lipiński. (2018). Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency anemia. Pharmaceuticals (Basel). 11,128. doi:10.3390/ph11040128
2. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Dr hab. Małgorzata Lenartowicz, prof. UJ



Kraków 04. 08 2020

Miejscowość, data

Podpis

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział Pana mgr Mateusza Szudzika w niżej wymienionej pracy był wiodący i pierwszoplanowy. Praca ta jest wynikiem Jego własnych oryginalnych hipotez, organizacji i pracy laboratoryjnej oraz ich ostatecznego zredagowania. Mój udział w tej pracy ograniczył się do bieżącej konsultacji wyników, pomocy w analizach laboratoryjnych oraz ostatecznego współredagowania tekstu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionej publikacji w opracowaniu monograficznym pod tytułem „**Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990**” stanowiących rozprawę doktorską Pana mgr Mateusza Szudzika

1. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). *Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran*. Annals of Animal Science. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

Miejscowość, data

Kraków, 10/08/2020

Podpis

Aleksandra Bednarz

Declaration of agreement for use of publication in monographic doctoral thesis

I agree to use the following publication in preparing the monographic doctoral thesis entitled: **“Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990”**

Used publication:

1. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020). Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. *Annals of Animal Science*. doi: 10.2478/aoas-2020-0084.

I would like to underline, that in the above-mentioned article Mateusz Szudzik had the major contribution in creating and realization of the scientific hypotheses, conducting laboratory work, performing statistical analysis.



5 august 2020

Nijmegen

Prof. Dr. Dorine W. Swinkels, MD, PhD

Declaration of agreement for use of publication in monographic doctoral thesis

I agree to use the following publication in preparing the monographic doctoral thesis entitled: **“Wpływ suplementacji mieszanej prosiąt żelazem na metabolizm tego mikroelementu, rozwój osobniczy i jakość tuszy u świń rasy wbp i linii 990”**

Used publication:

1. Mateusz Szudzik, Rafał Mazgaj, Paweł Lipiński, Robert Staroń, Aneta Jończy, Marek Pieszka, Małgorzata Lenartowicz, Aleksandra Bednarz, Marian Kamyczek, Coby Laarakkers, Dorine Swinkels, Rafał R. Starzyński. (2020) Innovative oral sucrosomial ferric pyrophosphate-based supplementation rescues suckling piglets from iron deficiency anemia similarly to commonly used parenteral therapy with iron dextran. *Annals of Animal Science*. doi: 10.2478/aoas-2020-0084

I would like to underline, that in the above-mentioned article Mateusz Szudzik had the major contribution in creating and realization of the scientific hypotheses, conducting laboratory work, performing statistical analysis.

Nijmegen

4 Aug 2020

Coby Laarakkers, BSc



