



INSTYTUT GENETYKI
I BIOTECHNOLOGII ZWIERZĄT
Polskiej Akademii Nauk

INSTITUTE OF GENETICS
AND ANIMAL BIOTECHNOLOGY
of the Polish Academy of Sciences

POLSKA AKADEMIA NAUK
INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII ZWIERZĄT

*Molekularne mechanizmy transportu żelaza przez łożysko
a regulacja metabolizmu żelaza noworodków świni
domowej i dzika: badania porównawcze*

Mgr Zuzanna Kopec

Promotor:

prof. dr hab. Paweł Lipiński

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt

Polskiej Akademii Nauk

Jastrzębiec 2024

*Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej były
finansowane z grantu NCN (Opus-17, ed. 33)
nr. 2019/33/B/NZ9/02566*

Spis treści

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:	5
Streszczenie	6
Abstract	8
1. Wstęp	10
1.1. Biologiczna funkcja żelaza	10
1.2. Zarys wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza	11
1.3. Zarys ogólnoustrojowej homeostazy żelaza	13
1.3.1. Wchłanianie żelaza	13
1.3.2. Recykling żelaza	15
1.3.3. Transferyna główny nośnik żelaza w organizmie	16
1.3.4. Oś regulatorowa hepcydyna-ferroportyna	17
1.3.5. Ferroksydazy	18
1.4. Transport żelaza przez łożysko i jego regulacja	19
1.5. Noworodkowa niedokrwistość z niedoboru żelaza u świni domowej	21
2. Hipotezy pracy	25
3. Cele pracy	25
4. Materiały i metody	26
4.1. Zwierzęta doświadczalne	26
4.1.1. Świnie rasy Wielka Biała Polska	26
4.1.2. Lochy i prosięta dzika	28
4.2. Pobieranie próbek krwi, siary i tkanek	30
4.3. Pomiar wskaźników erytrocytarnych (RBC) i parametrów żelaza w osoczu krwi	30
4.4. Pomiar zawartości żelaza w próbkach łożyska, wątroby i siary	31
4.5. Pomiar zawartości miedzi w próbkach łożyska, wątroby i siary	31
4.6. Pomiar poziomu Hepcidyny-25 i erytroferonu w osoczu krwi	31
4.7. Sekwencjonowanie następnej generacji (RNA-Seq)	32
4.8. Izolacja RNA z tkanek i ilościowy PCR w czasie rzeczywistym	33
4.9. Przygotowanie ekstraktów białkowych i analiza Western Blot	34
4.10. Analiza immunofluorescencji (IF) i mikroskopia konfokalna przekrojów łożyska	36
4.11. Analizy statystyczne	38
4.12. Zgody etyczne	38
5. Wyniki i dyskusja	39

6.	Wnioski	49
7.	Bibliografia	50
8.	Załączniki	61
8.1.	Informacje o charakterze udziału i wkładzie autorów w publikacjach	61
8.2.	Publikacje	66

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

1. **Kopeć Z**, Starzyński RR, Jończy A, Mazgaj R, Lipiński P. Role of Iron Metabolism-Related Genes in Prenatal Development: Insights from Mouse Transgenic Models. *Genes* (Basel). 2021 Sep 2;12(9):1382. doi: 10.3390/genes12091382. PMID: 34573364; PMCID: PMC8465470.
IF= 4,141 MNiSW=100
2. **Kopeć Z**, Mazgaj R, Starzyński RR, Wang X, Opiela J, Smorąg Z, Gajda B, Nicpoń J, Lenartowicz M, Ogłuszka M, Gralak MA, Lipiński P. Impact of litter size on the hematological and iron status of gilts, sows and newborn piglets: a comparative study of domestic pigs and wild boars. *BMC Vet Res*. 2024 Feb 23;20(1):64. doi: 10.1186/s12917-024-03905-3. PMID: 38389107; PMCID: PMC10885442.
IF= 2,3 MNiSW=140
3. **Kopeć Z**, Starzyński RR, Lenartowicz M, Grzesiak M, Opiela J, Smorąg Z, Gajda B, Nicpoń J, Ogłuszka M, Wang X, Mazgaj R, Stankiewicz A, Płonka W, Pirga-Niemiec N, Herman S, Lipiński P. Comparison of Molecular Potential for Iron Transfer across the Placenta in Domestic Pigs with Varied Litter Sizes and Wild Boars. *Int J Mol Sci*. 2024 Sep 5;25(17):9638. doi: 10.3390/ijms25179638. PMID: 39273585; PMCID: PMC11395084
IF= 4,9 MNiSW=140.

Streszczenie

Noworodkowa niedokrwistość z niedoboru żelaza (ang. *iron deficiency anemia*, IDA) jest dobrze udokumentowaną patologią, regularnie występującą u prosiąt świni domowej (*Sus scrofa domestica*). Brakuje natomiast doniesień o statusie czerwonych krwinek (ang. *red blood cell*, RBC) potomstwa dzika (*Sus scrofa*), przodka udomowionych świń. Pierwotną i główną przyczyną IDA u noworodków świni domowej jest niewystarczający poziom zapasów żelaza w wątrobie, zgromadzonych w okresie życia płodowego, które są głównym źródłem tego mikroelementu we wczesnym okresie rozwoju postnatalnego. Według powszechnej opinii, niedobór żelaza w wątrobie noworodków świni domowej jest pochodną dużej liczby prosiąt w miotach loch współczesnych ras świni domowej. Niezależnie, do występowania IDA przyczyniają się wysoka masa urodzeniowa prosiąt, ich szybkie tempo wzrostu i nierozwinięte mechanizmy absorpcji żelaza w dwunastnicy. Zawartość żelaza zapasowego noworodków zależy bezpośrednio od jego systemowej dostępności w organizmie matki oraz od efektywności molekularnych mechanizmów transportu tego mikroelementu przez łożysko. W mojej pracy, w pierwszej kolejności, podjęłam próbę porównania statusu RBC i statusu żelaza jednodniowych prosiąt dzika (pochodzących z miotów o typowej liczebności 4-6 zwierząt) i prosiąt świni domowej rasy Wielka Biała Polska (WBP), pochodzących z miotów o zróżnicowanej wielkości (10-12 prosiąt — duże mioty, 4-6 — małe mioty), uzyskanych na drodze transferu zarodków. Następnie podobne badania porównawcze przeprowadziłam na lochach dzika oraz loszkach WBP. Na koniec, skupiłam się na zbadaniu potencjalnych różnic w ekspresji genów odpowiedzialnych za transfer żelaza przez łożysko samic dzika i samic WBP w zależności od liczebności ich miotów.

Wykazałam, że u wszystkich jednodniowych prosiąt WBP bez względu na liczebność miotów, z których pochodzą występuje umiarkowana IDA, czego nie stwierdziłam u prosiąt dzika. Analiza porównawcza wykazała, że lochy dzika charakteryzują się wyższymi wartościami wskaźników czerwonych krwinek w stosunku do loszek WBP posiadających zarówno duże, jak i małe mioty. Loszki WBP z mniejszymi miotami charakteryzowały się wyższymi wartościami wskaźników RBC i parametrów żelaza w osoczu krwi w porównaniu do loszek posiadających duże mioty. Przy zastosowaniu sekwencjonowania RNA zbadalam ekspresję genów związanych z

metabolizmem żelazem w łożyskach dzika i loszek WBP o różnej liczebności miotów i nie stwierdziłam istotnych statystycznie różnic w ekspresji genów kodujących główne transportery żelaza biorące udział w przepływie żelaza od matki do płodów. Jednakże, w łożyskach dzika stwierdziłam wyższą ekspresję genów na poziomie mRNA kodujących zależne od miedzi ferroksydazy – ceruloplazminę, cyklopen i hefajstynę, które współdziałają z ferroportyną, jedynym znanym eksporterem żelaza, w uwalnianiu tego mikroelementu z łożyska do układu krążenia płodów. Badania immunofluorescencyjne skrawków łożyska wykazały ścisłą kolokalizację ceruloplazminy i cykloпенu z ferroportyną, na błonie apikalnej komórek nabłonkowych śluzówki macicy, co sugeruje aktywny udział tych właśnie ferroksydaz w transporcie żelaza do płodów.

Podsumowując, wyniki wskazują, że status RBC i żelaza noworodków WBP nie jest determinowany przez liczebność miotu i w przeciwieństwie do noworodków dzika znamionuje występowanie IDA. Znacząca wyższa ekspresja ferroksydaz w łożyskach dzika podkreśla ich rolę w efektywnym transferze żelaza do potomstwa. Dotyczy to szczególnie ceruloplazminy, która u innych gatunków ssaków, takich jak mysz czy człowiek, nie jest postrzegana jako główna ferroksydaza łożyskowa.

Abstract

Iron deficiency anemia (IDA) in neonates is a well-documented pathology, frequently observed in piglets of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). However, there is a lack of reports on the red blood cell (RBC) status of wild boar offspring (*Sus scrofa*), the ancestor of domesticated pigs. The primary and main cause of IDA in neonates of domestic pigs is an insufficient level of iron stores in the liver, accumulated during the fetal period, which are the main source of this micronutrient in the early postnatal development period. It is commonly believed that the hepatic iron deficiency in domestic pig neonates is a consequence of the large litter sizes in modern domestic pig breeds. Additionally, the occurrence of IDA is further influenced by the high birth weight of piglets, their rapid growth rate, and immature iron absorption mechanisms in the duodenum. The iron stores in neonates depend directly on its systemic availability in the mother's organism and on the efficiency of molecular mechanisms responsible for the transport of this micronutrient through the placenta. In my study, I first attempted to compare the RBC status and iron status of one-day-old wild boar piglets (from litters of typical size, 4-6 animals) with the Polish Large White (PLW) piglets, from litters of varying sizes (10-12 piglets — large litters, 4-6 piglets — small litters), obtained *via* embryo transfer. Subsequently, I conducted similar comparative studies on wild boar sows and PLW gilts. Finally, I focused on examining potential differences in the expression of genes responsible for iron transfer through the placenta of wild boar and PLW females, depending on their litter sizes.

I demonstrated that all one-day-old PLW piglets, regardless of their litter size, exhibited moderate IDA, which was not observed in wild boar piglets. Comparative analysis showed that wild boar sows had higher RBC values compared to PLW gilts, regardless of whether they had large or small litters. PLW gilts with smaller litters had higher RBC parameters and plasma iron levels compared to those with large litters. Using RNA sequencing, I examined the expression of iron metabolism-related genes in the placentas of wild boars and PLW gilts with different litter sizes and found no statistically significant differences in the expression of major iron transporters involved in iron transfer from the mother to fetuses. However, in wild boar placentas, I detected higher expression of mRNAs encoding copper-dependent ferroxidases — ceruloplasmin, zyklopen, and hephaestin, which cooperate with ferroportin, the only

known iron exporter, in releasing iron from the placenta into the fetal circulatory system. Immunofluorescence studies of placental sections revealed a close co-localization of ceruloplasmin and zyklopen with ferroportin on the apical membrane of uterine epithelial cells, suggesting the active involvement of these ferroxidases in iron transport to the fetuses.

In conclusion, the results indicate that the RBC and iron status of PLW neonates is not determined by litter size, and, unlike wild boar neonates, they are characterized by the occurrence of IDA. The significantly higher expression of ferroxidases in wild boar placentas suggests their role in efficient iron transfer to offspring. This applies particularly to ceruloplasmin, which in other mammalian species, such as mice or humans, is not considered the main placental ferroxidase.

1. Wstęp

1.1. Biologiczna funkcja żelaza

Żelazo jest mikroelementem niezbędnym dla życia większości organizmów z wyjątkiem nielicznych bakterii (Lasocki et al., 2014; Posey and Gherardini, 2000; Weinberg, 1997). Biologiczna funkcja żelaza jest pochodną jego właściwości oksydoredukcyjnych jako metalu przejściowego. Żelazo uczestniczy w reakcjach utleniania i redukcji, zmieniając stopień utlenienia między Fe^{3+} (jon żelazowy) i Fe^{2+} (jon żelazawy). Jest ono kluczowym, funkcjonalnym elementem kofaktorów takich jak centra żelazowo-siarkowe czy hem, które determinują aktywności i funkcje wielu enzymów i białek nieenzymatycznych, uczestniczących w podstawowych procesach biologicznych takich jak transport tlenu, oddychanie komórkowe, synteza DNA, synteza ATP, kontrola cyklu komórkowego, detoksykacja reaktywnych form tlenu czy synteza mikroRNA (Ponka et al., 2015). Jako kofaktor hydroksylazy prolylowej żelazo odgrywa również rolę w regulacji poziomu czynnika indukowanego niedotlenieniem (ang. *hypoxia inducible factor*, HIF), który nadzoruje transkrypcję genów związanych z erytropoezą, angiogenezą, glikolizą, proliferacją komórek oraz metabolizmem żelaza w odpowiedzi na poziom tlenu (Bernhardt et al., 2006). Wiele białek wiąże żelazo w formie hemu, związku składającego się z protoporfiryny IX oraz jonu Fe^{2+} . Najbardziej znaczącymi białkami hemowymi u ssaków są hemoglobina, która jest głównym składnikiem erytrocytów i nośnikiem tlenu w organizmie oraz mioglobina, która zaopatruje mięśnie w tlen. Inne przykłady białek, które wykorzystują hem jako grupę funkcyjną, to cytochromy, oksigenazy, peroksydazy, syntazy tlenku azotu (NO) oraz cyklaza guanylowa (Duvigneau et al., 2019; Voltarelli et al., 2023). Z drugiej strony, jony Fe^{2+} posiadają zdolność do generowania na drodze reakcji Fentona rodnika wodorotlenowego ($\text{OH}^{\bullet}$). Rodnik ten jest jedną z najbardziej reaktywnych chemicznie cząsteczek istniejących w przyrodzie. Posiada silne właściwości utleniające i reaguje z większością związków organicznych. Rodnik $\text{OH}^{\bullet}$ posiada zdolność uszkodzania błon lipidowych, białek oraz kwasów nukleinowych. Generowany w nadmiarze, odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu zaburzeń naczyniowych, takich jak miażdżycza tętnic czy prowadzi do neurodegeneracji. Jednym z głównych źródeł żelaza jonowego o aktywności redoks, jest hem uwalniany z wewnątrzkomórkowych białek hemowych

(Minotti and Aust, 1989; Repka and Hebbel, 1991; Van Dyke and Saltman, 1996). Biorąc pod uwagę biologiczną niezbędność żelaza jak i jego toksyczność, istotna jest ścisła homeostaza żelaza w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania organizmu. Kontrola homeostazy żelaza odbywa się na różnych poziomach, obejmując zarówno regulację wewnątrzkomórkową, jak i ogólnoustrojową.

1.2. Zarys wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza

Wewnątrzkomórkowa homeostaza żelaza jest wynikiem skoordynowanej regulacji kilku procesów: transportu żelaza do komórki, jego magazynowania oraz usuwania do środowiska pozakomórkowego. Procesy te mają zapewnić jego wykorzystanie do syntezy hemu i centrów [Fe-S] oraz ograniczyć toksyczność żelaza. W procesach tych uczestniczą liczne białka, spośród których do najlepiej poznanych należą receptor transferyny 1 (TfR1), białko dzięki któremu zdecydowana większość komórek ssaków pobiera, na drodze endocytozy, żelazo związane z transferyną (Tf), transporter metali dwuwartościowych 1 (ang. *divalent metal transporter 1*, DMT1), transporter żelaza z endosomu do cytoplazmy, ferrytyna (Ft), białko magazynujące żelazo, wszechobecne w komórkach organizmów żywych oraz ferroportyna (Fpn), transporter żelaza jonowego z komórek do środowiska pozakomórkowego (Anderson and Vulpe, 2009). Stałą frakcją żelaza w komórkach jest cytoplazmatyczna zmienna pula żelaza (ang. *Labile Iron Pool*, LIP). LIP to frakcja jonów Fe^{2+} oraz Fe^{3+} , związanych z różnymi niskocząsteczkowymi ligandami, która jest zasilana przez żelazo transportowane do komórki oraz przez żelazo pochodzące z rozpadu wewnątrzkomórkowych białek wiążących ten metal. Pula ta jest źródłem żelaza dla syntezy hemu i centrów [Fe-S]. Jednocześnie, LIP może być źródłem żelaza biorącego udział w reakcji Fentona (Shvartsman and Ioav Cabantchik, 2012). W warunkach fizjologicznych, aby ograniczyć reakcję Fentona, stężenie żelaza w LIP utrzymuje się na możliwie najniższym poziomie (w zależności od rodzaju komórki od 0,1 do 1,2 μM), takim jednak, który zapewnia ciągłość reakcji biochemicznych, dla których niezbędny jest ten metal (Cabantchik et al., 2002; Kakhlon and Cabantchik, 2002). Głównym białkiem wiążącym żelazo i regulującym jego poziom w LIP jest ferrytyna. Ferrytyna składa się z 24 podjednostek H i L, tworząc strukturę przypominającą klatkę, która może pomieścić do 4500 jonów żelaza w postaci Fe^{3+} w swoim wnętrzu, stanowiącym rdzeń ferrytyny (Harrison and Arosio, 1996).

Podjednostka H-Ft posiada aktywność ferroksydazową, biorąc udział w utlenianiu jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} , co stanowi pierwszy etap wiązania żelaza przez cząsteczkę ferrytyny. W podjednostce L znajduje się specyficzne miejsce, w którym zawiązuje się mineralny rdzeń ferrytyny (Orino et al., 2001). Proces dostarczania żelaza do ferrytyny odbywa się przy udziale białka opiekuńczego PCBP1 (ang. *poly (rC) binding protein 1*). Uwalnianie żelaza z ferrytyny następuje poprzez jej degradację na drodze autofagii, znanej jako ferrytynofagia, z udziałem białka NCOA4 (ang. *nuclear receptor coactivator 4*) (Ryu et al., 2018). Ten mechanizm przyczynia się do utrzymania właściwego stężenia żelaza w cytoplazmatycznej LIP. Jedynym znanym białkiem transportującym żelazo z komórek a tym samym wpływającym na obniżenie poziomu LIP jest ferroportyna. Eksport żelaza wymaga aktywności ferroksydazowej jednej z 3 znanych ferroksydaz — hefajstyny (Heph), ceruloplazminy (Cp) i cykloпену (Zp), które utleniają jony Fe^{2+} do Fe^{3+} , bezpośrednio przed związaniem ich przez transferynę (Tf) osocza krwi (Helman et al., 2023). Kluczowym białkiem w metabolizmie żelaza każdej komórki jest oksygenaza hemowa 1 (HO1). Dzięki aktywności tego enzymu następuje degradacja cząsteczek hemu, uwalnianie z nich żelaza jonowego do LIP i ponowne wykorzystanie dla celów metabolicznych (Duvigneau et al., 2019). Wahania stężenia żelaza w LIP, stanowiącego zaledwie 3-5% całkowitego żelaza w komórce, są wskaźnikiem komórkowego niedoboru lub nadmiaru tego pierwiastka, co wywołuje odpowiednie reakcje regulatorowe, w tym potranskrypcyjny mechanizm oparty na aktywności białek IRP (Muckenthaler et al., 1998). Jego funkcjonowanie polega na oddziaływaniu lub braku oddziaływania białek regulatorowych Irp1 i Irp2 (ang. *Iron regulatory proteins 1 and 2*) z elementami odpowiedzi na żelazo (ang. *Iron Responsive Elements, IRE*) w obrębie niepodlegających translacji regionach (ang. *untranslated region, UTR*) 5' lub 3' mRNA kodujących podjednostki Ft, TfR1, DMT1 i Fpn. W warunkach niskiego stężenia żelaza w komórce, białka IRP wiążą się ze specyficznymi sekwencjami IREs, które występują w 5'-UTR mRNA podjednostek ferrytyny (H-Ft i L-Ft) lub mRNA Fpn i blokują ich translację. Z drugiej strony, bezpośrednie oddziaływania pomiędzy białkami IRP i motywami IRE w 3'-UTR mRNA DMT1 i TfR1 zwiększa okres półtrwania tych transkryptów. Odwrotna regulacja syntezy podjednostek Ft, Fpn, TfR1 i DMT1, będąca konsekwencją braku wiązania IRPs z IRE, występuje przy wysokim poziomie żelaza.

1.3. Zarys ogólnoustrojowej homeostazy żelaza

Organizm dorosłego człowieka zawiera około 3-5g żelaza (około 45-60mg/kg masy ciała), związanego głównie z hemoglobiną erytrocytów krwi oraz ich komórek prekursorowych w szpiku kostnym. Codziennie, w szpiku kostnym powstaje około 20 ml krwi (co odpowiada liczbie około 200×10^{12} erytrocytów), wymaga to dostarczenia około 20 mg żelaza (czyli $2-3 \times 10^{15}$ atomów żelaza), i stanowi niemal 80% dziennego zapotrzebowania na ten pierwiastek u ludzi (Muckenthaler et al., 2017). Większość żelaza pochodzi ze starzejących się erytrocytów, które ulegają fagocytozie w układzie siateczkowo-śródbłonkowym osiadłych makrofagów (ang. *reticuloendothelial system*, RES). Erytrofagocytoza zachodzi głównie w śledzionie ale także w wątrobie, gdzie stare lub uszkodzone erytrocyty są rozpoznawane i pochłaniane przez odpowiednio makrofagi czerwonej miazgi (ang. *red pulp macrophages*, RPM) i komórki Browicza-Kupffera. W wyniku trawienia erytrocytów, enzymatycznego rozkładu hemoglobiny i zawartego w niej hemu, jonowe żelazo w ilości 25-30 mg żelaza na dobę, przekierowywane jest przez makrofagi do krwi, gdzie wiąże się z transferyną i w kompleksie z tym białkiem jest dostarczane do wszystkich komórek organizmu, głównie do prekursorów erytrocytów w szpiku kostnym (około 20-25mg). U ssaków nie istnieje fizjologiczny szlak usuwania żelaza z organizmu. Dobowe straty żelaza sięgające 1-2 mg żelaza wiążą się ze złuszczeniem enterocytów w przewodzie pokarmowych, komórek naskórka i z drobnymi ubytkami krwi. Straty te są kompensowane poprzez absorpcję żelaza zawartego w pokarmie (Steinbicker and Muckenthaler, 2013).

1.3.1. Wchłanianie żelaza

Żelazo dostępne w diecie występuje w dwóch głównych formach: jonowej (nieorganicznej) i hemowej (organicznej). Żelazo hemowe pochodzi głównie z produktów pochodzenia zwierzęcego, gdzie wchodzi w skład hemoglobiny i mioglobiny. Natomiast żelazo jonowe (niehemowe) pochodzi głównie z produktów roślinnych. Głównym miejscem wchłaniania żelaza jonowego są enterocyty początkowego odcinka dwunastnicy, spolaryzowane komórki nabłonka jelitowego

wyposażone w białkowe transportery żelaza zlokalizowane w środkowej i górnej części kosmków jelitowych. Obecność transporterów jonów Fe stwierdzono również w komórkach nabłonkowych jelita grubego (Blachier et al., 2007; Johnston et al., 2006; Mackenzie and Garrick, 2005; Takeuchi et al., 2005). Większość żelaza nieorganicznego w diecie występuje w formie jonów Fe^{3+} , które przed transportem przez błonę apikalną enterocytów muszą być zredukowane do jonów Fe^{2+} przy udziale enzymów redukcyjnych, takich jak reduktaza dwunastniczego cytochromu b, (ang. *Duodenal cytochrome b reductase*) (Camaschella et al., 2020; Gulec et al., 2014; Lane et al., 2015; Sharp and Srai, 2007). Po zredukowaniu, jony Fe^{2+} są transportowane przez rąbek szczoteczkowy enterocytów do wnętrza tych komórek za pośrednictwem transporterów błonowych, takich jak DMT1. W cytoplazmie enterocytów żelazo może być wykorzystane do celów metabolicznych, gromadzone w kompleksie z ferrytyną lub uwalniane do krwiobiegu przez występującą na błonie bazolateralnej enterocytów Fpn, gdzie wiąże się z cyrkulującą w surowicy krwi apo-transferyną. W procesie transportu żelaza przez Fpn do krwi aktywnie uczestniczy hefajstyna, miedziozależny enzym z rodziny ferroksydaz (Donovan et al., 2005; McKie et al., 2000; Ward and Kaplan, 2012), którym będzie poświęcony podrozdział 1.3.5 *Ferroksydazy*. Wchłanianie żelaza jest rygorystycznie regulowane przez organizm, co ma szczególne znaczenie, z uwagi na fakt, że jak już wspomniałam, nie istnieje fizjologiczny szlak usuwania tego mikroelementu z organizmu. W przypadku niedoboru lub nadmiaru żelaza organizm aktywuje szereg mechanizmów adaptacyjnych w celu zwiększenia lub zmniejszenia wchłaniania tego pierwiastka. Jednym z kluczowych wewnątrzenterocytarnych czynników regulujących wchłanianie żelaza jest czynnik transkrypcyjny Hif-2 α (ang. *hipoxia inducible factor 2*), który stymuluje ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za transport żelaza, takich jak Dcytb i DMT1. Ponadto, w zależności od poziomu LIP w enterocytach, białka Irf1 i Irf2 regulują stabilność mRNA kodujących Dmt1, Tfr1 oraz przebieg translacji mRNA kodujących Fpn oraz podjednostki H i L ferrytyny (H- i L-Ft), co prowadzi do zmiany poziomu w/w białek. Co ciekawe, w warunkach niskiego poziomu LIP w enterocytach translacja mRNA Hif-2 α jest hamowana przez system IRP/IRE (mRNA Hif-2 α zawiera w końcu 5' sekwencję IRE (Sanchez et al., 2007), a jego stabilność na poziomie białka zwiększa się. Ta przeciwna regulacja wskazuje na konieczność finezyjnego dopasowania ilości absorbowanego żelaza. W odpowiedzi na zmniejszone zapotrzebowanie systemowe,

żelazo zawarte w LIP enterocyty może być gromadzone w kompleksie z ferrytyną i ulega wydaleniu z organizmu wraz ze złuszcżającymi się enterocytami.

Wchłanianie żelaza hemowego jest bardziej efektywne niż żelaza jonowego, jego mechanizmy są jednak nadal słabo poznane (Cao et al., 2014; Dutt et al., 2022; West and Oates, 2008). Wiadomo, że hem może być transportowany z diety przez białka HRG1 (ang. *Heme Responsive Gene 1*) i HCP1 (ang. *Heme Carrier Protein 1*) (Yanatori et al., 2010). We wnętrzu enterocyty hem poddawany jest degradacji enzymatycznej przez oksygenazę hemową 1 (HO1), w wyniku której uwalniane są jony Fe^{2+} (które zasilają LIP), CO i biliwerdyna (Fraser et al., 2011). Część nierozłożonego hemu może być przetransportowana przez błonę bazolateralną przy udziale białka FLVCR1 (ang. *Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor 1*) (Khan and Quigley, 2013).

Wchłanianie żelaza może być również modulowane przez zawartość w diecie takich związków jak fityniany, polifenole, inne metale dwuwartościowe (np. cynk) oraz przez stężenie tlenu (Al Hasan et al., 2016; Engelmann et al., 1998; Hallberg et al., 1987; Petry et al., 2010; Renassia and Peyssonnaud, 2019; Shah et al., 2009; Weinborn et al., 2017).

Niezależnie od regulacji wewnątrzenterocyty, transport żelaza przez błonę bazolateralną enterocytów do krwi jest regulowany systemowo przez oś regulatorową hepcydyna-ferroportyna (podrozdział 1.3.4. *Oś regulatorowa hepcydyna-ferroportyna*).

1.3.2. Recykling żelaza

Makrofagi odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy żelaza w organizmie, odpowiadając za recyrkulację nawet 90-95% tego pierwiastka, co zapewnia jego ciągły dopływ do komórek organizmu. W różnych tkankach wyróżnia się specyficzne subpopulacje tych komórek, takie jak makrofagi czerwonej miazgi w śledzionie, komórki Browicza-Kupffera w wątrobie oraz makrofagi szpiku kostnego. Posiadają one rozbudowany zestaw białek umożliwiających pobieranie zarówno żelaza niehemowego, jak i hemowego. Szczególnie istotnym procesem jest odzyskiwanie jonów Fe na drodze fagocytozy starzejących się erytrocytów i ich rozkładu (Sukhbaatar and Weichhart, 2018). Nawet 20-25 mg żelaza jest uwalniane ze starych i wadliwych

erytrocytów (Camaschella et al., 2020). Eksport żelaza z makrofagów jest zależny od ferroportyny i ceruloplazminy (Sukhbaatar and Weichhart, 2018). Ostatnie badania dotyczące dziedzicznej aceruloplazminemii (ang. *hereditary aceruloplasminemia*, HA) wskazują, że mimo braku aktywności ceruloplazminy, która jest uważana za kluczową ferroksoydazę w uwalnianiu żelaza przez makrofagi, nie obserwuje się przeciążenia żelazem w makrofagach wątroby i śledziony, zarówno u ludzi, jak i w modelu zwierzęcym (u szczurów $Cp^{-/-}$) (Kenawi et al., 2019). Wyniki te sugerują, że inne, nieznanne jeszcze mechanizmy mogą odgrywać ważną rolę w procesie magazynowania i uwalniania tego pierwiastka przez te komórki. Mimo niedoboru hepcydyny oraz braku aktywności ferroksoydazowej, nie zaobserwowano podwyższonego poziomu żelaza niezwiązanego z transferyną w osoczu, co wskazuje na bardziej złożoną regulację metabolizmu żelaza niż dotychczas sądzono (Kenawi et al., 2019).

1.3.3. Transferyna główny nośnik żelaza w organizmie

Po uwolnieniu żelaza do krwi przez enterocyty (żelazo pochodzące z diety), makrofagi (żelazo odzyskane ze starych erytrocytów) oraz hepatocyty (żelazo pochodzące z zapasów), jest ono wiązane przez transferynę (Tf), białko transportujące ten mikroelement do wszystkich komórek organizmu. Tf syntezowana jest głównie w hepatocytach. Jej cząsteczka posiada dwa miejsca wiązania żelaza o wysokim powinowactwie do jonów Fe^{3+} . Utrzymuje ona żelazo w formie rozpuszczalnej, ograniczając jednocześnie powstawanie toksycznych wolnych rodników. Transport żelaza do komórek odbywa się przez wiązanie cząsteczki holo-transferyny, (holo-Tf, przyłączającej dwa jony Fe^{3+}) ze swoimi receptorami (ang. *Transferrin receptor 1 and 2*, TfR1 i TfR2), występującymi na powierzchni większości komórek organizmu, głównie hepatocytów i erytroblastów, komórek prekursorowych erytrocytów (Gomme et al., 2005). Po związaniu Tf z TfR1 na błonie komórkowej, kompleks Tf-TfR1 ulega endocytozie, i w środowisku endosomu o niskim pH, jony Fe^{3+} oddysocjują od cząsteczki Tf a następnie uwalniane są do cytoplazmy przy udziale białka DMT1 (Ollinger and Roberg, 1997; Larson, Howie and So, 2004; Mehlhase et al., 2005). Kompleks TfR1-apo-Tf (apo-Tf, jest to forma transferyny pozbawiona jonów żelaza) ulega redystrybucji na błonę komórkową, po czym apo-Tf jest uwalniana do krwiobiegu (Leverence et al., 2010). Poziom transferyny we krwi jest istotnym wskaźnikiem

statusu żelaza w organizmie. Jej wyższy poziom wskazuje z reguły na niedobór tego mikroelementu. U ludzi transferryna zwykle jest wysycona żelazem w około 30%. Jeśli wysycenie jest mniejsze niż 16%, wskazuje to na niedobór żelaza, natomiast jeśli przekracza 45%, sugeruje to nadmiar żelaza (Szóke and Panteghini, 2012). Przekroczenie 45% wysycenia transferryny może prowadzić do obecności w surowicy krwi toksycznej frakcji żelaza, niezwiązanego z transferryną (ang. *Non-Transferrin Bound Iron*, NTBI), co może być przyczyną niekontrolowanego napływu żelaza do komórek i w konsekwencji uszkodzania narządów wewnętrznych, głównie wątroby, serca i trzustki (Brissot et al., 2012).

1.3.4. Oś regulatorowa hepcydyna-ferroportyna

Głównym regulatorem uwalniania żelaza z komórek dośrodowiska zewnątrzkomórkowego jest hepcydyna, 25-aminokwasowy peptyd o masie 2,7 kDa zawierający cztery wiązania dwusiarczkowe. Wydzielana przez hepatocyty do krwi, hepcydyna wpływa na trzy kluczowe procesy: ogranicza uwalnianie żelaza wchłoniętego przez enterocyty, hamuje uwalnianie żelaza z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego w śledzionie oraz kontroluje uwalnianie żelaza z hepatocytów. Przyłączenie się hepcydyny do ferroportyny wywołuje jej internalizację, prowadząc do proteasomalnej degradacji. Wzrost poziomu hepcydyny zachodzi w odpowiedzi na zwiększone stężenie żelaza w organizmie, co zmniejsza jego absorpcję w dwunastnicy i uwalnianie z makrofagów w śledzionie, ograniczając tym samym jego toksyczność (Jordan et al., 2009; Nemeth and Ganz, 2021, 2021; Park et al., 2001). W przypadku niedoboru żelaza poziom hepcydyny obniża się, co zwiększa absorpcję żelaza oraz jego uwalnianie z makrofagów i hepatocytów. Dodatkowo, hypoksja (niedotlenienie) oraz czynniki erytropoetyczne uwalniane przez komórki prekursorowe erytrocytów w szpiku kostnym szczególnie podczas intensywnej erytropoezy wpływają na obniżenie ekspresji hepcydyny (Kautz et al., 2014a; Pak et al., 2006; Pasricha et al., 2016; Vokurka et al., 2006).

1.3.5. Ferroksydazy

Transport jonów żelaza przez błony komórkowe wymaga zmiany ich stopnia utlenienia. W transporcie żelaza przez Fpn do środowiska pozakomórkowego uczestniczą miedziozależne enzymy, ferroksydazy, które katalizują utlenianie jonów żelaza Fe^{2+} do jonów Fe^{3+} . Jony miedzi (Cu) są niezbędne, ponieważ tworzą aktywne centra redoks w cząsteczkach ferroksydaz, które pośredniczą w przenoszeniu elektronów podczas utleniania jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} (Liu et al., 2022). Aktywność enzymatyczna ferroksydaz jest jednym z głównych elementów interakcji między miedzią i żelazem w organizmach ssaków. Znane są trzy ferroksydazy: ceruloplazmina (Cp), hefajstyna (Heph) i cyklopen (Zp), które występują w większości komórek ssaków ale szczególną rolę pełnią w hepatocytach, komórkach mózgu (Cp), enterocytach (Heph) i syncytiotrofoblastach (Zp) (Helman et al., 2023). Moje badania po raz pierwszy dostarczyły dowodów na to, że wszystkie trzy ferroksydazy ulegają ekspresji w matczynej części łożyska dzika i świni domowej WBP, a dwie z nich, Cp i Zp, wydają się współpracować z Fpn w transporcie żelaza do płodów (Kopeć et al., 2024b). Poza rolą w transporcie żelaza przez błony komórkowe, utlenianie jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} przez ferroksydazy zmniejsza ryzyko tworzenia ROS, tym samym chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym. Istnieją dwie główne formy ceruloplazminy, będące produktami alternatywnego splicingu genu *Cp*: ceruloplazmina rozpuszczalna (ang. *soluble ceruloplasmin*, sCp), uwalniana do krwiobiegu i transportująca jony miedzi do różnych tkanek organizmu, oraz ceruloplazmina związana z błoną komórkową (ang. *Glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin*, GPI-Cp), która współpracuje z ferroportyną (Fpn) na powierzchni komórek. GPI-Cp odgrywa istotną rolę w katalizowaniu utleniania jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} , dzięki czemu mogą być związane z transferryną, która nie posiada aktywności ferroksydazowej. Myszy z delecją genu *Cp* są żywotne i nie wykazują niedoboru żelaza przy urodzeniu (Harris et al., 1999), co sugeruje, że *Cp* nie jest istotna/niezbędna dla transportu żelaza przez łożysko u tych zwierząt. Z drugiej strony, aceruloplazminemia, rzadka choroba dziedziczona w sposób autosomalny recesywny, charakteryzująca się brakiem lub zmniejszeniem aktywności *Cp* prowadzi do umiarkowanej anemii, ale, co bardziej istotne, do neurodegeneracji związanej z akumulacją żelaza w mózgu. Brak aktywnej ceruloplazminy uniemożliwia efektywne utlenianie jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} , co skutkuje odkładaniem się żelaza w tkankach, w tym w układzie nerwowym, prowadząc do postępujących zaburzeń

neurologicznych (Marchi et al., 2019). Hefajstyna (Heph) jest homologiem Cp, ulegającym ekspresji głównie w enterocytach dwunastnicy. Myszy *Heph*^{-/-} przejawiają zdolność do przeżycia oraz posiadają niezmienny fenotyp po urodzeniu, co sugeruje, że działanie tego genu nie jest konieczne dla transportu żelaza przez łożysko (B. K. Fuqua et al., 2014). Myszy o genotypie *sla* (ang. *sex-linked anemia*) wykazują anemię, która wynika z mutacji w genie kodującym *heph*, leżącym na chromosomie X (stąd inna nazwa tej anemii — ang. *X-linked anemia*). W przypadku anemii *sla* zaburzone jest utlenianie jonów Fe²⁺ na błonie bazolateralnej enterocytów dochodzi do deficytu w efektywnym utlenianiu żelaza, co prowadzi do zmniejszenia efektywności transportu żelaza przez ferroportynę. Skutkuje to akumulacją żelaza w enterocytach, obniżonym poziomem żelaza w krążeniu, co w konsekwencji prowadzi do niedokrwistości. Anemia u myszy *sla* charakteryzuje się zmniejszoną liczbą erytrocytów oraz niskim poziomem hemoglobiny (Wang et al., 2019). Myszy pozbawione zarówno Cp, jak i Heph (*Cp*^{-/-}*Heph*^{-/Y}) przeżywają bez istotnych nieprawidłowości przy urodzeniu (Hahn et al., 2004). Trzecia ferroksydaza, cyklopen (Zp, kodowana przez gen *hephl1*), jest ekspresjonowana głównie w łożysku. Występuje w labiryncie łożyskowym, trofoblastach gąbczastych i woreczku żółtkowym mysich łożysk. Myszy pozbawione Zp wydają się być fizjologicznie normalne przy urodzeniu, z wyjątkiem skręconych wąsów, sugerujących niedobór miedzi, a nie żelaza (B. Fuqua et al., 2014). Pomimo obecności wszystkich trzech ferroksydaz w łożysku, badania pojedynczych delecji sugerują, że ich funkcje prawdopodobnie nakładają się na siebie, nawet myszy z potrójną delecją genów kodujących ferroksydazy przeżywają, choć cechują się anemią (B. Fuqua et al., 2014).

1.4. Transport żelaza przez łożysko i jego regulacja

Łožysko jest narządem pośredniczącym w wymianie substancji odżywczych, gazów i produktów przemiany materii między matką a rozwijającym się płodem. Istotną funkcją łożyska jest także produkcja hormonów i ochrona immunologiczna płodu.

Warto podkreślić, że w budowie łożyska występują istotne różnice międzygatunkowe (między myszą, człowiekiem i świnią). U myszy, łożysko składa się z dwóch warstw syncytiotrofoblastów (SynT-I i SynT-II), które mają bezpośrednią komunikację cytoplazmatyczną poprzez połączenia szczelinowe. Natomiast u ludzi,

łożysko zwykle składa się z jednej warstwy syncytiotrofoblastów. Co więcej, u myszy i ludzi występuje łożysko hemochorialne, co oznacza, że krew matki ma bezpośredni kontakt z kosmówką. W przypadku świń, budowa łożyska różni się istotnie od tych dwóch gatunków. Świnie posiadają łożysko epiteliochorialne, gdzie bariera między krwią matki a zarodkiem składa się z wielu warstw, w tym nabłonka endometrium macicy, nabłonka trofoblastu i śródbłonka naczyń krwionośnych. Dodatkowo jest ono (i) rozproszone tzn., że kosmki są rozmieszczone równomiernie na całej powierzchni kosmówki; (ii) rzekome, czyli nieinwazyjne ponieważ nabłonek kosmówki przylega tylko do nabłonka endometrium macicy i nie występuje jego naruszenie. Stanowi to znaczne wyzwanie dla transportu składników odżywczych od matki do płodu, ponieważ składniki odżywcze muszą być transportowane: 1.) przez cytoplazmę i błonę podstawną komórek śródbłonka naczyń krwionośnych macicy; 2.) przez tkanki łączne endometrium; 3.) przez błonę podstawną i cytoplazmę komórek nabłonka endometrium macicy; 4.) przez błonę podstawną i cytoplazmę komórek nabłonka trofoblastu; 5.) przez tkanki łączne kosmówki; 6.) przez błonę podstawną i cytoplazmę komórek śródbłonka naczyń krwionośnych kosmówki (Almeida and Dias, 2022; Karniychuk and Nauwynck, 2013).

Wiedza na temat ekspresji i rozmieszczenia kluczowych transporterów żelaza w łożysku pochodzi głównie z badań na myszach i ludziach. TfR1 ulega ekspresji głównie po stronie apikalnej syncytiotrofoblastów łożyska, od strony krążenia matczynego (Sangkhae and Nemeth, 2019). Przy fizjologicznym pH (7,4) matczyne holo-Tf łączy się z TfR1 łożyska. Powstały kompleks Tf-Fe₂-TfR1 jest internalizowany do wnętrza syncytiotrofoblastu na drodze endocytozy (Mayle et al., 2012). W miarę obniżania wartości pH wewnątrz endosomu, jony Fe³⁺ oddysocjują od cząsteczek Tf i są redukowane do Fe²⁺ przez feroreduktazy. Apo-Tf powraca na powierzchnię komórki, gdzie ulega odłączeniu od TfR1. Wśród kandydatów na endosomalne transportery żelaza z krążenia matki do syncytiotrofoblastów wymienia się również DMT1, ZIP14 i ZIP8 (Sangkhae and Nemeth, 2019). Żelazo jest eksportowane z syncytiotrofoblastów łożyska do płodu za pośrednictwem Fpn, zlokalizowanej na błonie bazolateralnej tych komórek skierowanych ku płodowi (Sangkhae and Nemeth, 2019). Ogólnoustrojowy knock-out genu *Slc40a1*, kodującego Fpn, u myszy jest letalny już we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego. Funkcję transportu przez Fpn ułatwia obecność ferroksydaz (B. Fuqua et al., 2014). Żelazo wyeksportowane z komórek łożyska przez

Fpn jest wiązane przez Tf płodową, której stężenie w krążeniu płodowym stopniowo wzrasta w trakcie ciąży (Fryer et al., 1993).

Transport żelaza przez łożysko może być regulowany przez sygnały matczyne, łożyskowe i płodowe. Choć istnieje powszechne przekonanie, że płód jest "doskonałym pasożytem", zdolnym do pozyskania wystarczającej ilości żelaza niezależnie od statusu żelaza matki, to wyniki badań przeprowadzonych na ludziach i makakach potwierdziły, że zapasy żelaza u noworodków są ograniczane, gdy matka cierpi na niedobór żelaza lub jest anemiczna (Allen, 2000; Radlowski and Johnson, 2013). Transfer żelaza przez łożysko do płodu zależy od biodostępności żelaza w krążeniu matki, a jego przepływ wzrasta wraz z rozwojem ciąży. Zwiększone zapotrzebowanie na żelazo w trakcie ciąży jest zaspokajane poprzez wykorzystanie matczynych zapasów żelaza zgromadzonych w wątrobie i śledzionie (Gao et al., 2015; Hubbard et al., 2013). Te adaptacje systemowe są w dużej mierze regulowane przez matczyną hepcydynę. U kobiet, w czasie ciąży poziomy hepcydyny maleją do prawie niewykrywalnych poziomów w drugim i trzecim trymestrze ciąży, co prowadzi do zwiększenia biodostępności żelaza w układzie krążenia matki i jego transportu przez łożysko (van Santen et al., 2013). Oprócz matczynej, również płodowa hepcydyna może wpływać na ilość żelaza transferowanego przez łożysko do układu krążenia płodu poprzez regulację Fpn łożyskowej, która nie jest dostępna dla hepcydyny matczynej. W badaniach na zwierzętach stwierdzono jednak bardzo niskie poziomy hepcydyny płodowej, nawet w warunkach fizjologicznych, co sugeruje maksymalną ekspresję Fpn łożyskowej (Willemetz et al., 2014).

1.5. Noworodkowa niedokrwistość z niedoboru żelaza u świni domowej

Główną patologią będącą skutkiem niedoboru żelaza jest niedokrwistość (ang. *iron deficiency anemia*, IDA), na którą cierpi około 1.5-2 mld ludzi na świecie (GBD 2021 Anaemia Collaborators, 2023). Na IDA najbardziej narażone są dzieci w okresie niemowlęcym, nastolatki (szczególnie dziewczęta) w okresie dojrzewania oraz kobiety w ciąży (GBD 2021 Anaemia Collaborators, 2023). Wysoka jest również częstość występowania niedoboru żelaza u wcześniaków o niskiej masie urodzeniowej (Jin et al., 2015; Long et al., 2012; Lundström et al., 1977). Akumulacja żelaza w wątrobie płodu,

która jest głównym źródłem tego mikroelementu dla organizmu we wczesnym okresie pourodzeniowym, zachodzi głównie w ostatnim okresie ciąży. Skrócona ciąża wpływa na znaczące obniżenie zawartości żelaza w wątrobie wcześniaków (Balesaria et al., 2012; Gambling et al., 2011; Mégier et al., 2022) i jego ogólnoustrojowy deficyt. Zapasy żelaza w wątrobie noworodków urodzonych w terminie, charakteryzujących się prawidłową urodzeniową masą ciała, wystarczają na zaspokojenie zapotrzebowania na ten mikroelement na około pół roku po urodzeniu.

Świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) to gatunek ssaka, u którego w okresie neonatalnym, w przeciwieństwie do człowieka, regularnie występuje IDA. Badania przeprowadzone już w latach dwudziestych ubiegłego wieku wykazały występowanie u młodych prosiąt niedoboru żelaza i związanej z nim niedokrwistości (McGovan and Crichton, 1924). Niedokrwistość prosiąt jest niedokrwistością niedobarwliwą (hipochromiczną) i mikrocytarną (Szudzik et al., 2018; Warner and Kamran, 2024), na co wskazują obniżone średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach (ang. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC) oraz zmniejszona średnia objętość erytrocytów (ang. *Mean Corpuscular Volume*, MCV). Większość danych literaturowych uznaje stężenie hemoglobiny na poziomie 8 g/dl jako granicę anemii u prosiąt (Egeli et al., 1998a; Kegley et al., 2002a). Skutkami IDA są osłabienie, zmniejszone tempo wzrostu i obniżona odporność prosiąt. Pierwotną i główną przyczyną występowania IDA u prosiąt są niskie zapasy żelaza, zgromadzone w czasie ciąży, które szacuje się na około 50 mg, co stanowi jedną z najniższych wartości wśród ssaków (Svoboda and Drabek, 2005; Venn et al., 1947). Ilość żelaza zmagazynowanego w wątrobie prosiąt w czasie ciąży jest wystarczająca na pokrycie zapotrzebowania jedynie przez pierwsze 3-4 dni życia zwierząt. U prosiąt niesuplementowanych żelazem, zawartość żelaza w wątrobie spada pięciokrotnie w czwartym dniu życia w porównaniu z dniem narodzin, a siódmego dnia jest praktycznie niewykrywalna, (Lipiński et al., 2010). Do pozostałych przyczyn występowania IDA u prosiąt należy zaliczyć niskie stężenie żelaza w sianie i mleku lochy (jest ono o około połowę mniejsze w porównaniu ze stężeniem w mleku kobiety, wahając się od 1,4 do 4 mg/L (Brady et al., 1978; Jin et al., 2015; Kopeć et al., 2024a) oraz nierozwinięte w pierwszych dniach po urodzeniu, molekularne mechanizmy wchłaniania żelaza w dwunastnicy (Lipiński et al., 2010). Ekspresja dwóch głównych transporterów żelaza — DMT1 i ferroportyny, występujących odpowiednio na błonie apikalnej i bazolateralnej enterocytów dwunastnicy pojawia się

dopiero ok. 4 dnia życia (Lipiński et al., 2010). Zakładając, że 1-tygodniowe prosię spożywa dziennie od 0,5 do 1 litra mleka, a współczynnik wchłaniania żelaza zawartego w mleku wynosi 60-90%, dzienna absorpcja to około 1 mg żelaza. Jest to ilość znacznie mniejsza od dziennego zapotrzebowania szacowanego na około 7 mg (Braude, 1967; Venn et al., 1947). To duże zapotrzebowanie wiąże się z niezwykle szybkim tempem wzrostu prosiąt, które w ciągu pierwszych 6 tygodni życia 10-krotnie zwiększają masę ciała (Kim et al., 2018)

Suplementacja prosiąt żelazem w 2-4 dniu po urodzeniu, przyjmująca najczęściej postać domięśniowej iniekcji dekstranu żelaza (kompleksu wodorotlenku żelazowego z dekstranem w ilości 100-200 mg Fe na prosię) jest rutynowym zabiegiem weterynaryjnym, skutecznie zapobiegającym występowaniu IDA u prosiąt. Jest to jednak procedura, która może wywoływać skutki uboczne związane z toksycznością jonów żelaza (np. zapasć sercowo-naczyniową) (Egeli et al., 1998a). Ponadto, po domięśniowych iniekcjach, istnieje ryzyko powikłań, takich jak infekcje w miejscu podania, czy reakcje alergiczne.

Warto odnotować, że doustna suplementacja ciężarnych loch różnego rodzaju związkami żelaza (solami żelaza, żelazem sukrosomalnym, hemoglobina) w celu poprawy statusu tego mikroelementu u nowonarodzonych prosiąt jest nieskuteczna (Mazgaj et al., 2020). Brak profilaktycznych skutków tej nieinwazyjnej procedury narzuca istotne pytanie o wydajność molekularnych mechanizmów transportu żelaza przez łożysko lochy. Jest to również zasadne pytanie w kontekście, rosnącej liczby prosiąt w miotach loch współczesnych ras świń i zdolności łożyska do transferu wystarczającej ilości żelaza dla większej liczby płodów. Poprawa ilościowa tej cechy reprodukcyjnej jest od wielu lat jednym z nadrzędnych celów selekcyjnych w hodowli trzody chlewnej. Warto zauważyć, że na przestrzeni ostatnich 10 lat liczba żywo urodzonych prosiąt w miotach dwóch polskich ras WBP i Polska Biała Zwisloucha (PBZ) wzrosła o około 1 sztukę (POLSUS, 2024). Na dużą liczbę prosiąt w miocie świni domowej wskazywano jako na przyczynę niskiej zawartości żelaza w wątrobie noworodków świńskich, która w konsekwencji prowadzi do niedokrwistości (Baxter et al., 2013; Fernández-Llario and Mateos-Quesada, 1998). Co ciekawe, w literaturze brakuje udokumentowanych doniesień dotyczących występowania IDA u noworodków dzika (*Sus scrofa*) współcześnie żyjącego w warunkach dzikich przodka świni domowej, którego mioty liczą 4-6 prosiąt (2-3 razy mniej niż lochy świni domowej).

Wydaje się zatem, że wszechstronna analiza porównawcza dzika i świni domowej, którą podjęłam w pracy doktorskiej, obejmująca profil czerwonokrwinkowy i status żelazowy łoża i prosiąt oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za transfer żelaza przez łożysko może dostarczyć nowych danych wyjaśniających, co leży u podstaw zaburzenia homeostazy żelaza u noworodków świni domowej. Badania nad mechanizmami niedoboru żelaza u świń są istotne zarówno z perspektywy naukowej, jak i praktycznej, ze względu na znaczenie tych zwierząt w przemyśle rolniczym.

2. Hipotezy pracy

Hipoteza 1: Liczebność miotu loch świni rasy Wielka Biała Polska (WBP) nie wpływa na status czerwonokrwinkowy i status żelaza noworodków.

Hipoteza 2: W przeciwieństwie do noworodków świni WBP, u noworodków dzika nie występuje niedokrwistość z niedoboru żelaza.

Hipoteza 3: Nie występują istotne różnice w ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w transporcie żelaza przez łożyska pomiędzy lochami dzika i lochami świni WBP.

3. Cele pracy

Cel 1: Porównanie parametrów czerwonokrwinkowych oraz statusu żelaza i jego regulacji między prosiętami dzika i prosiętami świni rasy WBP pochodzącymi z miotów o różnej liczebności.

Cel 2: Porównanie parametrów czerwonokrwinkowych oraz statusu żelaza między lochami dzika i lochami świni WBP posiadającymi mioty o różnej liczebności.

Cel 3: Porównanie ekspresji genów oraz lokalizacji białek uczestniczących w transporcie żelaza przez łożysko między lochami dzika i lochami świni WBP posiadającymi mioty o różnej liczebności.

4. Materiały i metody

4.1. Zwierzęta doświadczalne

4.1.1. Świnie rasy Wielka Biała Polska

Doświadczenie na loszkach i prosiętach rasy WBP przeprowadzono w Doświadczalnej Stacji Trzody Chlewnej w Żernikach Wielkich, należącej do Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego (Balice, Polska). 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). 6-miesięczne loszki były utrzymywane w standardowych warunkach (70% wilgotności, temperatura 22°C) w kojach ciążowych (2,2 × 0,65 × 1,8 m) ze słomianą ściółką. Samice były umieszczane pojedynczo w kojach porodowych (2,4 × 3,4 m) w 110 dniu ciąży. Samicom podawano standardową paszę dla ciężarnych loch zawierającą 120 mg Fe/kg. Zawartość Fe określona metodą spektrometrii płomieniowej

4.1.1.1. Uzyskiwanie małych i dużych miotów loszek WBP poprzez regulowany transfer zarodków (ang. *embryo transfer*, ET) oraz sztuczne zapłodnienie (ang. *artificial insemination*, AI)

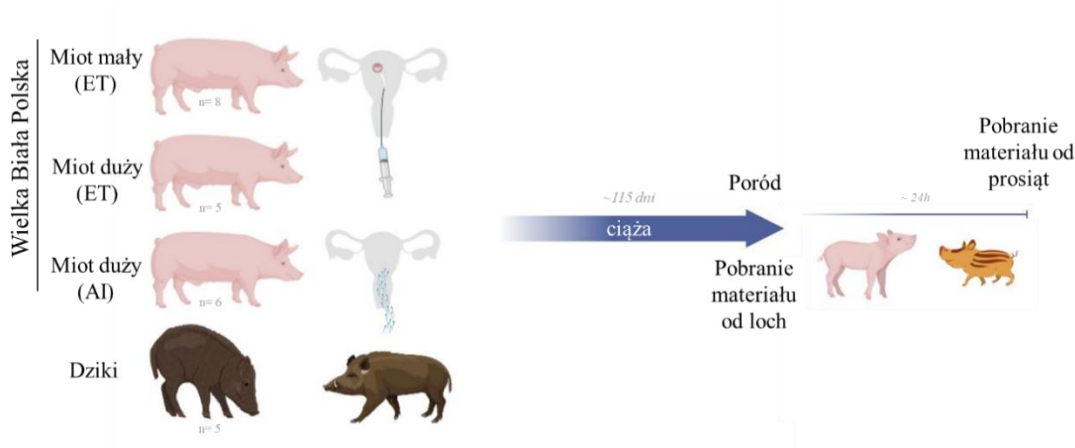
W celu uzyskania małych i dużych miotów, zarodki do transferu (ang. *Embryo Transfer*, ET) pobierano od loszek-dawczyń. Dawczyniami zarodków było piętnaście 6-miesięcznych loszek o masie 90-110 kg, które były poddawane superowulacji poprzez domięśniowe podanie 1500 IU (ang. *international unit*) PMSG (ang. *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*, Gonadotropina Surowicy Ciężarnej Klaczy; Folligon, Intervet, Boxmeer, Holandia). Po 72 godzinach zwierzętom podawano 1000 IU hCG (ang. *human chorionic gonadotropin*, Ludzka Gonadotropina Kosmówkowa; Chorulon, Intervet, Boxmeer, Holandia). W dniu rui samice były dwukrotnie unasieniane w odstępach 12-godzinnych standardową dawką nasienia pochodzącą od jednego knura.

Zarodki uzyskiwano chirurgicznie 72-74 godziny po podaniu hCG poprzez przepłukiwanie każdego jajowodu 20 ml PBS z dodatkiem BSA o temperaturze 38°C. Następnie zarodki wyszukiwano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego i przenoszono do PBS z dodatkiem 20% FCS i poddawano ocenie morfologicznej. Biorczyniami zarodków były 6-miesięczne loszki ważące około 90 kg. Ruja u loszek była synchronizowana domięśniowym podaniem 750 IU PMSG. Po 72 godzinach biorczyniom podawano 500 IU HCG i obserwowano objawy rui przez kolejne 24 godziny. Transfer zarodków przeprowadzano chirurgicznie, wykonując nacięcie wzdłuż linii białej. Do transferu biorczynie były przygotowane poprzez premedykację azaperonem (Stresnil, Elanco Animal Health, Stany Zjednoczone Ameryki) domięśniowo (1 ml/10 kg masy ciała) oraz ketaminą (Ketamina, Biowet, Polska) i ksylazyną (Sedazin, Biowet, Polska) dożylnie (po 10 mg/10 kg masy ciała). Transfer odbywał się pierwszego lub drugiego dnia po synchronizacji rui (dzień rui definiowano jako dzień 0). Zarodki były umieszczane w roztworze PBS + 10% FCS (około 10 μ l) w specjalnej rurce poliuretanowej za pomocą strzykawki Hamilton® (objętość 50 μ l). Rurkę z zarodkami wprowadzano do jajowodu przez lejek.. Liczba transferowanych zarodków zależała od grupy doświadczalnej: grupa I – 6-8 zarodków na każdą biorczynię; grupa II – 14-16 zarodków na każdą biorczynię. Skuteczność transferu oceniano za pomocą badania ultrasonograficznego biorczyń w 30 i 45 dniu po transferze zarodków. Przy użyciu regulowanego ET uzyskano duże mioty od pięciu loszek oraz małe mioty od siedmiu loszek liczące odpowiednio 10 ± 1 i 4 ± 2 prosiąt. Od każdej z loszek do badań wybrano dwa prosięta, w oparciu o ich masę ciała (średnia z miotu). W grupie kontrolnej prosięta uzyskano po rutynowo wykonywanym w hodowli trzody chlewnej, sztucznym unasiennieniu (ang. *artificial insemination*, AI). Sześć 1-letnich loch było poddanych superowulacji przez domięśniowe podanie 1500 IU PMSG. Po 72 godzinach samicom podano 1000 IU hCG. W dniu rui samice były dwukrotnie unasieniane w odstępach 12-godzinnych standardową dawką nasienia pochodzącą od jednego knura. Skuteczność zapłodnienia oceniano za pomocą badania ultrasonograficznego w 30. i 45. dniu po AI. Po urodzeniu prosięta zostały włączone do badania jako zwierzęta kontrolne, aby wykluczyć potencjalny wpływ procedury ET na zmiany wartości wskaźników czerwonych i parametrów żelaza noworodków. Uzyskano średnio mioty liczące 14 ± 2 prosiąt. Od każdej z loszek do badań wzięto dwa prosięta, w oparciu o ich masę ciała (średnia z miotu).

W opisywanym doświadczeniu termin „duży miot” był używany wyłącznie w celu porównania z małymi miotami. Mioty liczące 14 ± 2 i 12 ± 1 prosiąt, uzyskane odpowiednio poprzez AI i ET, reprezentują średnią wielkość miotu w rasie WBP (Nowak et al., 2020). We współczesnej hodowli trzody chlewnej zdarzają się również mioty liczące nawet 18-20 prosiąt, które określa się obiektywnie jako duże mioty (Björkman et al., 2017; Kemp et al., 2018; Oliviero, 2023; Thorsen et al., 2017). Jednakże częstotliwość takich dużych miotów u rasy WBP jest stosunkowo niska (Nowak et al., 2020). Ponadto uzyskanie miotów liczących 18-20 prosiąt za pomocą technologii ET jest praktycznie niemożliwe.

4.1.2. Lochy i prosięta dzika

Doświadczenie na dzikach przeprowadzono w Leśnym Zakładzie Doświadczalnym Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Złotówek, Polska). Klinicznie zdrowe samice dzików odłowione w lasach powiatów trzebnickiego i oleśnickiego, w województwie Dolnośląskim, były utrzymywane w półdzikich warunkach na farmie leśnej monitorowanej przez 12 kamer, które były używane do śledzenia ich zachowań, w szczególności rui, krycia i przygotowań do porodu. Farma była podzielona na trzy zagrody o powierzchni około 1300 m². W każdej zagrodzie umieszczono dwie samice, a w celu ich pokrycia wprowadzono odyńca na okres huczki, czyli okres godowy (od listopada do stycznia). Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i były codziennie dokarmiane ziarnem kukurydzy, ziemniakami i świeżą paszą zieloną. Warunki terenowe w jakich przebywały dziki umożliwiały rycie i inne naturalne zachowania, takie jak kąpiele błotne i ocieranie się o pnie drzew. W doświadczeniu użyto sześciu loszek i loch w wieku 1-2 lat o masie 60-80 kg oraz ich potomstwa (2 prosięta od każdej loszki/lochy), w oparciu o ich masę ciała (średnia z miotu).



Rycina 1. Schemat przeprowadzonego doświadczenia.

Doświadczenie obejmowało następujące grupy: (i) loszki rasy Wielka Biała Polska o małych miotach (4 ± 2 prosiąt) uzyskanych w wyniku transferu zarodków (ET); (ii) loszki rasy Wielka Biała Polska o dużych miotach (10 ± 1 prosiąt) uzyskanych w wyniku ET; (iii) loszki rasy Wielka Biała Polska o dużych miotach (14 ± 2 prosiąt) uzyskanych po sztucznej inseminacji (AI); (iv) lochy/loszki dzika z miotem (4 ± 2 prosiąt) po naturalnym kryciu. Po ~ 115 dniach ciąży, łożysko zostało pobrane natychmiast po wydaleniu, ~ 24 godziny po porodzie od każdej z loch pobrano próbki biologiczne (krew i siarę). Po ~ 24 h po porodzie, z miotu każdej z loch wybrano 2 prosięta (na podstawie średniej masy ciała w miocie), które poddano eutanazji a następnie pobierano próbki krwi i tkanek.. Wykonano za pomocą BioRender.com

Tabela 1. Liczba zwierząt użyta w doświadczeniu.

a – c liczebność miotu różniła się istotnie przy $p \leq 0,05$.

Grupa	Liczebność miotu	Liczba loch	Liczba prosiąt
Dzik	4 ± 2^a	5	10
WBP mały miot (ET)	4 ± 2^a	8	15
WBP duży miot (ET)	10 ± 1^b	5	10
WBP duży miot (AI)	14 ± 2^c	6	12

4.2. Pobieranie próbek krwi, siary i tkanek

Przed pobraniem krwi samice dzików były premedykowane domięśniowym podaniem (za pomocą broni Palmera) mieszaniny medetomidyny (0,03 mg/kg m.c.), ketaminy (9 mg/kg m.c.) i midazolamu (0,2 mg/kg m.c.). Krew od loszek i loch WBP oraz dzików była pobierana 24 godziny po porodzie przez nakłucie żyły szyjnej (*Vena jugularis externa*) do heparynizowanych probówek. Próbkę były wirowane (1500×g, 10 min, 4°C) w celu oddzielenia osocza. Osocze było natychmiast dzielone na porcje i przechowywane w -80°C. Jednodniowe prosięta WBP i dzików były premedykowane 4 mg/kg azaperonu (Stresnil, Elanco; 40 mg/ml) przez domięśniowe podanie, a krew pobierano przez nakłucie serca. Po pobraniu krwi natychmiast przeprowadzano eutanazję poprzez dosercowe podanie mieszaniny 33,3 mg/ml pentobarbitalu sodu i 26,7 mg/ml pentobarbitalu; (0,5 ml/kg m.c. Morbitalu Biowet, Polska). Próbkę siary (2-3 ml) od samic WBP i dzików były pobierane ręcznie do plastikowych probówek po uprzednim oczyszczeniu wymienia. Próbkę łożyska były pobierane z części matczynej kosmówkowo-omoczniowej na każdym rogu, natychmiast po jego wydaleniu, a następnie płukane PBS. Wątroba była pobierana od prosiąt po laparotomii. Wszystkie próbki tkanek były natychmiast mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C do czasu analizy.

4.3. Pomiar wskaźników erytrocytarnych (RBC) i parametrów żelaza w osoczu krwi

Parametry czerwonekrwinkowe były określane za pomocą zautomatyzowanego analizatora hematologicznego IDEXX ProCyte Dx (IDEXX Laboratories Inc., Stany Zjednoczone Ameryki). Poziom żelaza oraz stężenie ferrytyny w osoczu były mierzone za pomocą biochemicznego analizatora COBAS INTEGRA 400 plus (Roche Diagnostics, Szwajcaria). Pomiar całkowitej zdolności transferyny do wiązania jonów żelaza (ang. *Total Iron Binding Capacity*, TIBC) wykonywano przy użyciu zestawu firmy BioMaxima zgodnie z zaleceniami producenta. Wysycenie transferyny obliczano zgodnie ze wzorem:

$$TfS = \frac{\text{stężenie Fe w osoczu}}{TIBC} * 100\%$$

4.4. Pomiar zawartości żelaza w próbkach łożyska, wątroby i siary

Zawartość żelaza niehemowego w wątrobie, łożysku i siarce określano poprzez trawienie kwasem próbek w temperaturze 100°C przez 10 minut, a następnie kolorymetryczny pomiar kompleksu żelaza-ferrozyny (absorbancja przy 560 nm, Beckman DU-68, Stany Zjednoczone Ameryki).

4.5. Pomiar zawartości miedzi w próbkach łożyska, wątroby i siary

Poziom miedzi w łożysku mierzono za pomocą absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Próbki trawiono w 2ml wrzącego kwasu azotowego klasy Suprapur (Merck, Niemcy). Po schłodzeniu do temperatury pokojowej (RT) każdą próbkę zawieszono w 10ml dejonizowanej wody. Próbki materiału odniesienia przygotowano w podobny sposób. Stężenie miedzi zmierzono za pomocą techniki AAS (piec grafitowy) (AAnalyst 800, Stany Zjednoczone Ameryki). Trzy próbki kwasu azotowego zastosowano, jako próby ślepe.

4.6. Pomiar poziomu Hepcidyny-25 i erytroferonu w osoczu krwi

Do ilościowego oznaczenia poziomu hepcydyny w osoczu krwi użyto komercyjnie dostępnego testu immunoenzymatycznego z zastosowaniem techniki kanapkowej zgodnie z zaleceniami producenta (DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA Kit; DRG Instruments GmbH, Niemcy). Do ilościowego oznaczenia poziomu erytroferonu w osoczu krwi użyto komercyjnie dostępnego testu immunoenzymatycznego (ELISA EPO ELISA Kit #ABIN6955643, Antibodies online, Stany Zjednoczone Ameryki).

4.7. Sekwencjonowanie następnej generacji (RNA-Seq)

Całkowite RNA komórkowe zostało wyizolowane z tkanek łożyska (20 mg) przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu SV Total Isolation System (Promega, Stany Zjednoczone Ameryki) zgodnie z instrukcjami producenta. Jakość RNA była kontrolowana za pomocą metody kwantyfikacji kwasów nukleinowych opartej na fluorescencji oraz analizy długości fragmentów. Po wstępnej kontroli jakości próbki zostały poddane trawieniu DNazą w celu usunięcia wykrytego resztkowego DNA. Przygotowanie biblioteki RNA obejmowało użycie 10ng RNA oraz zestawu do przygotowania biblioteki SMART-Seq Stranded (Takara Bio, Japonia). Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono dla 5 osobników w każdej grupie przez firmę CeGaT (Tubingen, Niemcy). Jakość sekwencjonowania była bardzo wysoka, o czym świadczy wartość Q30 wynosząca $\geq 87,83\%$. Oznacza to, że ponad 87,83% zsekwencjonowanych zasad miało wskaźnik jakości wynoszący co najmniej 30, co odpowiada dokładności odczytu na poziomie 99,9%. Sekwencjonowanie przeprowadzono na platformie Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, Stany Zjednoczone Ameryki), która jest dostosowana do sekwencjonowania na dużą skalę z wysoką dokładnością. Długość odczytów wynosiła 101 par zasad każdy (2 x 101 bp). Decyzja o sekwencjonowaniu 101 zasad na odczyt, zamiast standardowych 100, była celowa, aby zapewnić wysoką jakość odczytu setnej zasady. Dodatkowa zasada pomagała w utrzymaniu dokładności na końcach odczytów, które są zazwyczaj bardziej podatne na błędy. Demultipleksowanie odczytów sekwencji zostało wykonane przy użyciu oprogramowania Illumina bcl2fastq (2.20). Adaptery zostały przycięte za pomocą programu Skewer (wersja 0.2.2) (Jiang et al., 2014). W przypadku próbek przygotowanych zestawem Takara (SMART-Seq Stranded, Takara Bio, Japonia), pierwsze trzy nukleotydy drugiego odczytu sekwencji (Read 2) pochodzą od adaptera Pico v2 SMART. Te trzy nukleotydy zostały przycięte za pomocą programu Skewer (wersja 0.2.2). Przycięte surowe odczyty zostały następnie zmapowane do genomu Sscrofa11.1 za pomocą programu STAR (wersja 2.7.3) (Dobin et al., 2013). Analiza różnicowej ekspresji genów między grupami została przeprowadzona za pomocą DESeq2 (wersja 1.24.0) (Love et al., 2014) w środowisku R (wersja 4.0.4) (R Core Team 2015). DESeq2 wykorzystuje ujemny model uogólnionej regresji dwumianowej do testowania różnic w ekspresji genów na podstawie liczby ich wystąpień.

Wykorzystując znormalizowane liczebności, DESeq2 oblicza log2 fold change, a p-wartość raportuje istotność statystyczną tego wyniku (test Walda). Ze względu na porównanie tysięcy genów, konieczna była korekta dla wielokrotnych testów. Do tego celu użyto korekcji Benjamini-Hochberga (Benjamini and Hochberg, 1995) zaimplementowanej w DESeq2, aby dostosować wartość p (padj).

4.8. Izolacja RNA z tkanek i ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

Całkowite RNA komórkowe zostało wyizolowane z tkanek łożyska (20 mg) przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu SV Total Isolation System (Promega, Stany Zjednoczone Ameryki) zgodnie z instrukcjami producenta. Stężenie i czystość RNA zostały zmierzone odpowiednio spektrofotometrycznie za pomocą aparatu NanoDrop (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone Ameryki) przy długości fali 260 nm, i na podstawie obliczenia stosunku OD 260/280 i 260/230. Dwa mikrogramy całkowitego RNA poddano trawieniu DNAzą, zgodnie z protokołem producenta (Roche, Szwajcaria) a następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu cDNA Synthesis Kit® Transcriptor First Strand (Roche Diagnostics, Szwajcaria). Analiza ilościowa w czasie rzeczywistym PCR została przeprowadzona w aparacie LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Szwajcaria) przy użyciu par specyficznych dla badanych genów starterów (Tabela 2). Produkty amplifikacji zostały wykryte za pomocą SYBR Green I (Roche Diagnostics, Szwajcaria). Aby potwierdzić specyficzność amplifikacji, produkty PCR poddano analizie krzywej topnienia i elektroforezie w żelu agarozowym. Do analizy danych użyto oprogramowania LightCycler U96 wersja 1.1. Poziomy transkryptów zostały znormalizowane względem genu referencyjnego, wybranego spośród 5 genów, za pomocą oprogramowania NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software> (dostęp 10.2024)).

Tabela 2. *Lista starterów użytych do RT-qPCR.*

Gen	starter przedni (5'→3')	starter wsteczny (5'→3')
<i>Fpn</i>	TCGCCTAGTGTCATGACCAG	CAGAAACACAGACACCGCAA

<i>Tfr1</i>	GCCGAAGTGGCTGGTCATC	CAGACTCAGACCCATCTCCCT
<i>Dmt1</i>	GCAGGTGGTTGACGTCTGTA	CACGCCCCCTTTGTAGATGT
<i>Lft</i>	TGTTTGGACGGAACAGACCC	CTCATGGCTGGTCGGCAATA
<i>Rpl4</i>	CTCAGCGAATGAGAGCTGGT	GTGTTTCGGCGCATTGTCTT
<i>Cp</i>	AGGTCCACAACCTTCATGCCG	GTGCGTGTTTCACCTGGTACT
<i>HephL</i>	CTGTGCTTACCCACGTTGTC	GAAGGAAGGGACAAGGTCA
<i>Heph</i>	TCGCATCTTTCCAGCCACCT	GTGCTTGCATGCCACCTTTC
<i>Atp7b</i>	TGGGATCGGCTGCAAAGTCA	GGCCGCATCTGTTTCTGAGG
<i>Sod1</i>	AAGGCCGTGTGTGTGCTGAA	TGCACTGGTACAGCCTTGTGT
<i>Epo</i>	ACGCCTCATCTGTGACAGC	ACAGCTTTGTCCACATGCAG

4.9. Przygotowanie ekstraktów białkowych i analiza Western Blot

Do analizy białek tkanki homogenizowano w buforze do izolacji białek RIPA (Tris-HCl (pH 7.4): 50 mM, NaCl: 150 mM, Triton X-100: 1%, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate): 0.1%, Sodium deoxycholate: 0.5%, EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid): 1 mM) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone Ameryki). Homogenaty zostały poddane wirowaniu (12000 obr/min, Eppendorf 5415R, 20min, 4°C). Uzyskany supernatant przechowywano w -80°C. Stężenia białek zostały oznaczone za pomocą testu Bradforda (Biorad, Stany Zjednoczone Ameryki). Pomiar wykonano przy długości fali 595nm przy użyciu spektrofotometra DU®-68 Spectrophotometer (Beckman, Stany Zjednoczone Ameryki). Ekstrakty białkowe zawieszano w buforze obciążającym Laemmli 4×(Tris-HCl (pH 6.8): 250 mM, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate): 8%, Glicerol: 40%, β-merkaptotanol 10%, błękit bromofenolowy: 0.01%) i rozdzielano w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (żel zagęszczający 5% pH 6.8; żel rozwijający od 7% do 22% pH 8.8;) w buforze do elektroforezy przy stałym napięciu. Po zakończeniu elektroforezy, dokonywano transferu białek z żelu na błonę PVDF (aktywowaną uprzednio metanolem) w buforze do transferu przy stałym natężeniu prądu. Efektywność transferu i integralność białek

poddanych rozdzielaniu określano w oparciu o metodę barwienia żelu z wykorzystaniem czerwieni Ponceau: błonę PVDF po zakończonym transferze, inkubowano przez 5 minut w roztworze barwnika (0.1%(w/v) Ponceau S w 5%(v/v) kwasie octowym). Po odpłukaniu barwnika w 1×TTBS, membrany PVDF blokowano w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w proszku w 1×TTBS w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi tabela 3 w 1×TTBS w temp. 4°C przez noc (ok. 16 godz.). Następnie błony płukano kilkakrotnie w buforze 1×TTBS celem pozbycia się niezwiązanego do membrany przeciwciała pierwszorzędowego. Błony inkubowano z właściwymi przeciwciałami drugorzędowymi (Tabela 3) w 1×TTBS w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Wizualizacji prążków dokonywano metodą chemiluminescencyjną za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu (SuperSignal™ Western Blot Enhancer, Thermo Scientific, Stany Zjednoczone Ameryki). Kontrolę ilości białka zdeponowanego na żel, określono w oparciu o poziom ekspresji białka referencyjnego – β -aktyny.

Tabela 3. *Lista przeciwciał wykorzystanych w analizie Western blot.*

Białko	1° przeciwciało	stężenie	2° przeciwciało	stężenie
Fpn	Królicze przeciwciało poliklonalne #PA5-22993 (Invitrogen)	1:1000	Kozie przeciwciało poliklonalne anty-królicze #A6154 (Sigma-Aldrich)	1:10000
L-Ft	Królicze przeciwciało poliklonalne #ab69090, (Abcam)	1:1000	Kozie przeciwciało poliklonalne anty-królicze #A6154 (Sigma-Aldrich)	1:10000
β -Act	Mysie monoklonalne, #MA5-11869, (Thermo Fisher)	1:1000	Kozie przeciwciało poliklonalne anty-mysie, #A5278 (Sigma-Aldrich)	1:10000
Cp	Kozie Przeciwciało przeciwko człowiekowi	1:1000	Kozie przeciwciało poliklonalne #sc-2020 (Santa Cruz)	1:10000

	#C0911, (Sigma-Aldrich)		Biotechnology)	
DMT1	Królicze przeciwciało poliklonalne, #NRAMP22-A (Alpha Diagnostic)	1:1000	Koźie przeciwciało poliklonalne anti-królicze #A6154 (Sigma-Aldrich)	1:10000

4.10. Analiza immunofluorescencji (IF) i mikroskopia konfokalna przekrojów łożyska

Łożyska utrwalono w 4% paraformaldehydzie (MilliporeSigma, Stany Zjednoczone Ameryki) w PBS w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Po dwóch 30-minutowych płukaniach w PBS łożyska przepajano kolejno 12,5% i 25% roztworem sacharozy (Bioshop, Kanada) w temperaturze 4°C odpowiednio przez 2 godziny i 7 dni. Próbki łożyska następnie zatopiono w medium do zamrażania Cryomatrix (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone Ameryki), zamrożono w ciekłym azocie i krojono na 20µm skrawki przy użyciu kriomikrotomu (Leica, Niemcy). Skrawki inkubowano w PBS przez 10 minut i permeabilizowano w roztworze 0,1% Triton X-100 w PBS (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone Ameryki) przez 20 minut. Nieswoiste wiązanie przeciwciał blokowano poprzez inkubację skrawków tkanki w 3% BSA (Bioshop, Kanada) w PBS w temperaturze pokojowej (RT) przez 1,5 godziny. W celu wykrycia badanych białek skrawki inkubowano przez noc (około 16 godz.) w temperaturze pokojowej z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w 3% BSA (Bioshop, Kanada) w PBS. Przeciwciała pierwszorzędowe i przeciwciała drugorzędowe sprzężone z fluorochromem stosowane w analizie IF opisano w Tabeli 4. Następnie skrawki płukano 5 razy po 6 minut w roztworze PBS/0,1% Triton X-100 i inkubowano przez 1,5 godziny z przeciwciałem drugorzędowym rozcieńczonym w 3% BSA (Bioshop, Kanada) w PBS w temperaturze pokojowej. Na koniec skrawki przemywano przez 10 minut w PBS, następnie nakładano kroplę Vectashield z DAPI (Vector Labs, Stany Zjednoczone Ameryki) i przykrywano preparaty szkiełkami nakrywkowymi. Obecność ferrokazydaz i Fpn w komórkach endometrium oznaczono metodą podwójnej immunofluorescencyjnej lokalizacji badanych białek. Aby rozróżnić białka, przeciwciała drugorzędowe

sprężone z różnymi fluorochromami: Cy3 dla Cp i Zp oraz Alexa 488 dla Fpn i Alexa 488 dla Heph i Cy3 dla Fpn. W celu jednoczesnej immunolokalizacji Fpn i ferroksydaz skrawki łożyska inkubowano najpierw z przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-Fpn, a następnie z pierwszorzędowymi przeciwciałami przeciwko ferroksydazom. Następnie skrawki inkubowano z mieszaniną przeciwciał drugorzędowych. Skrawki następnie płukano 5 razy po 6 minut w roztworze PBS/0,1% Triton X-100, a na koniec przez 10 minut w PBS, następnie nakładano kroplę Vectashield z DAPI (Vector Labs, Stany Zjednoczone Ameryki) i przykrywano preparaty szkiełkami nakrywkowymi. Detekcję badanych białek na skrawkach łożyska przeprowadzono za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710 (CarlZeiss, Niemcy) przy użyciu obiektywu $\times 40$ i oprogramowania Zeiss ZEN.

Tabela 4. *Lista przeciwciał wykorzystanych w analizie Immunofluorescencji.*

Białko	1° przeciwciało	stężenie	2° przeciwciało	stężenie
Heph	Mysie monoklonalne, Santa Cruz Biotechnology), sc-365365	1:100	Kozie przeciwciało anti-mysie sprężone z fluorochromem Alexa488 (Jackson ImmunoResearch)	1:500
Cp	Królicze przeciwciało poliklonalne anti-Cp (Dako) Q0121	1 : 100	Kozie przeciwciało anti-królicze skoniugowane z fluorochromem Cy3® (Jackson ImmunoResearch)	1:500
Zp	Królicze poliklonalne, US Biological, No. 036510	1:100	Kozie przeciwciało anti-królicze skoniugowane z fluorochromem Cy3® (Jackson ImmunoResearch)	1:500
Fnp	Kozie poliklonalne, Invitrogen, #PA5-143047	1:150	Ośle przeciwciało anti-kozie sprężone z fluorochromem Alexa Fluor Plus 488 (Invitrogen)	1:500

Fnp	Królicze poliklonalne Alpha Diagnostic, #MTP11-A	1: 150	Kozie przeciwciała anty-królicze skoniugowane z fluorochromem Cy3® (Jackson Immunoresearch)	1:500
-----	--	--------	---	-------

4.11. Analizy statystyczne

Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD (odchylenie standardowe). W publikacji nr. 2 przed porównaniem średnich wykonano test Levene’a w celu oceny równości wariancji grupowych. Dla wszystkich przedstawionych wyników test Levene’a wykazał brak istotnych różnic w wariancjach. Do statystycznej oceny danych zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA). Po wykryciu istotnych różnic zastosowano test post-hoc Scheffego ($p < 0,05$). W publikacji nr. 3 normalność rozkładu badanych cech była weryfikowana za pomocą testu Shapiro-Wilka. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) została użyta do statystycznej oceny danych, a po niej zastosowano test post-hoc Tukey’a ($p < 0,05$). Różnice między analizowanymi parametrami uznano za statystycznie istotne przy wartości $P \leq 0,05$. Każdy eksperyment wykonano co najmniej w dwóch powtórzeniach.

4.12. Zgody etyczne

Wykorzystanie zwierząt w doświadczeniach i wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (eksperyment na dziku; nr pozwolenia: 081/2020/P1) oraz II Lokalną Komisję Etyczną ds. Badania na zwierzętach w Krakowie (doświadczenie na świniach WBP; zezwolenie nr 399/2020). Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Dyrektywy UE 2010/63/UE w sprawie doświadczeń na zwierzętach. Wykorzystanie w doświadczeniu świń oraz wszystkie procedury uzyskały akceptację Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego, właściciela Zakładu Doświadczalnego w Żernikach Wielkich. Wykorzystanie dzika w doświadczeniu i wszystkie procedury uzyskały akceptację Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, właściciela Centrum Badań nad Leśnictwem i Hodowlą Zwierzyny łownej.

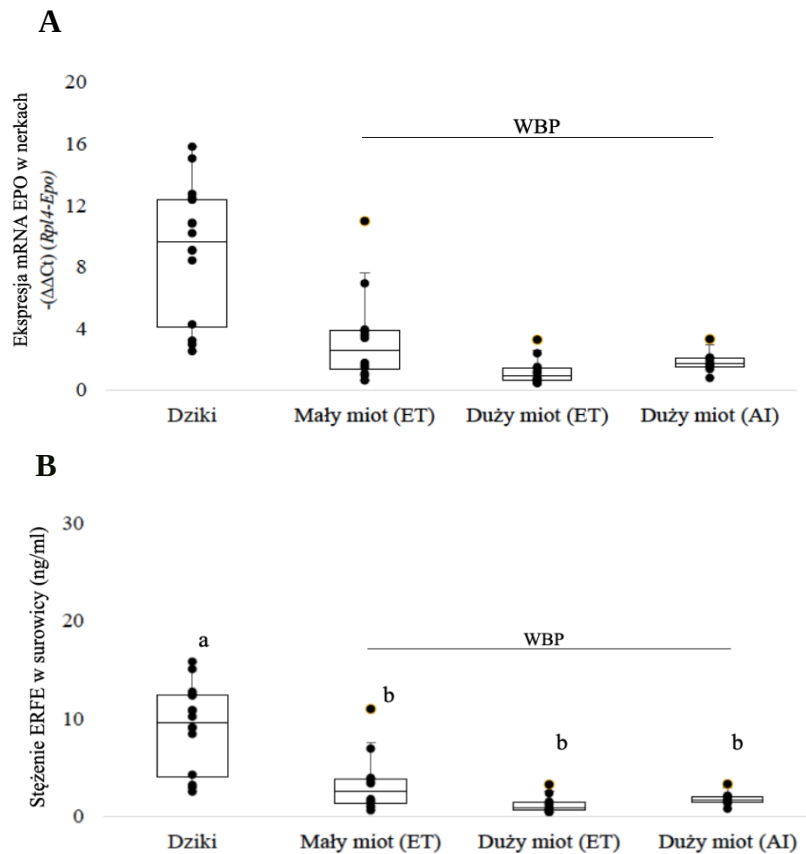
5. Wyniki i dyskusja

Poprawa cech rozrodczych, w tym liczebności miotu, była jednym z głównych celów hodowców trzody chlewnej w ciągu ostatniego stulecia. Jednak postępujące zwiększanie liczby prosiąt w miocie nasuwa pytania o fizjologiczne możliwości ciężarnych loch w dostarczaniu wystarczających ilości składników odżywczych, w tym żelaza, ich licznemu potomstwu. Rzeczywiście, niedobór żelaza jest najczęściej występującym zaburzeniem w okresie noworodkowym u świń domowych, prowadzącym do ciężkiej niedokrwistości, jeśli zwierzęta te nie są suplementowane żelazem (Lipiński et al., 2010). Co ciekawe, nie udokumentowano niedoboru żelaza, a tym bardziej niedokrwistości na tym tle u potomstwa dzika, przodka udomowionych świń, co sugeruje, że homeostaza żelaza u tych zwierząt jest utrzymana. Według mojej najlepszej wiedzy, w niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy wykazano, że u potomstwa dzika nie występuje niedokrwistość na tle niedoboru żelaza, o czym świadczą wartości podstawowych wskaźników czerwonych krwinek (RBC), takich jak liczba erytrocytów, poziom hemoglobiny i hematokryt, znacznie przekraczające wartości graniczne występowania niedokrwistości (Kopeć et al., 2024a) (Ryc. 1A–C, publikacja 2). Z kolei prosięta rasy WBP, niezależnie od wielkości miotu, z którego pochodziły, miały podobne wartości wskaźników RBC (brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy prosiętami WBP z poszczególnych grup), znamionujące niedokrwistość z niedoboru żelaza (Egeli et al., 1998b; Kegley et al., 2002b). Różnice między prosiętami dzika i WBP były statystycznie istotne. Szczególnie zaskakująca jest różnica w statusie RBC między potomstwem dzika, a prosiętami WBP pochodzącymi z miotów o wielkości podobnej do wielkości miotu dzika. Wyniki te dowodzą, że występowanie niedokrwistości u noworodków prosiąt WBP nie zależy od wielkości miotu i że brak niedokrwistości u potomstwa loch dzika nie wynika z mniejszej liczebności ich miotów. Ponadto wyniki sugerują, że ciężarne lochy WBP, nawet przy małej liczbie prosiąt w miocie (4–6 sztuk), nie są w stanie dostarczyć przez łożysko wystarczających ilości żelaza, aby zaspokoić potrzeby erytropoetyczne swojego potomstwa. Według utrwalonej opinii, określona pula żelaza transportowana przez łożysko ciężarnej lochy świni domowej jest rozdzielana między zazwyczaj około kilkanaście płodów i staje się niewystarczająca dla prawidłowego rozwoju postnatalnego. Z kolei optymalne wykorzystanie żelaza u dzików było ukształtowane

przez naturalne mechanizmy selekcyjne, które pozwalają dostosować ilość żelaza transport i jego wykorzystanie, zapewniając prawidłowy rozwój prosiętom pochodzącym z miotów o stałej liczebności.

Nieoczekiwanie, poziom żelaza w osoczu krwi prosiąt dzika był znacznie niższy niż u prosiąt rasy WBP, niezależnie od liczebności miotu (Ryc. 1D, publikacja 2). Może to być związane z bardziej dynamicznym przebiegiem erytropoezy u prosiąt dzika, co skutkuje bardziej intensywnym pobieraniem żelaza związanego z transferryną przez syntezujące hemoglobinę prekursorowe komórki erytrocytów w szpiku kostnym. Za wyższym tempem erytropoezy u prosiąt dzika przemawia zwiększona ekspresja mRNA erytropoetyny (Epo) w nerkach (Ryc. 2A, autoreferat). Epo jest glikoproteinowym hormonem produkowanym głównie przez komórki śródmiąższowe nerki, który stymuluje proliferację i różnicowanie późnych erytroidalnych komórek prekursorowych oraz hamuje ich apoptozę w odpowiedzi na niedotlenienie i niski poziom żelaza (Cantarelli et al., 2019). Wyższy poziom Epo w nerkach prosiąt dzika sugeruje, że erytropoeza jest u nich bardziej aktywna, co wymaga dostarczenia większych ilości żelaza dla odpowiednio większej produkcji hemoglobiny i dojrzewania większej liczby erytrocytów. Na prawdopodobny mechanizm regulujący większą dostępność żelaza dla erytropoezy u prosiąt dzika wskazuje wyższy poziom erytoferronu (Erfe) w osoczu krwi tych noworodków (Ryc. 2B, autoreferat). Erfe jest białkiem uwalnianym przez erytroblasty w odpowiedzi na stymulację erytropoetyną i działa jako regulator homeostazy żelaza (Kautz et al., 2014b), poprzez hamowanie produkcji hepcydyny, peptydu wytwarzanego w wątrobie, która blokuje uwalnianie żelaza z makrofagów, hepatocytów i enterocytów. Wyższy poziom Erfe w osoczu krwi prosiąt dzika stanowi więc, w przypadku pobudzonej erytropoezy, element regulacji adaptacyjnej, która umożliwia zwiększenie absorpcji żelaza oraz zwiększenie jego uwalniania z magazynów tkankowych i transport do szpiku kostnego, gdzie jest wykorzystywane do syntezy hemoglobiny w prekursorach erytrocytów.

Nieoczekiwanie, zwiększony poziom Erfe nie wpłynął na zmniejszenie stężenia hepcydyny w osoczu krwi prosiąt (Ryc. 1G, publikacja 2). Należy jednak podkreślić, że było ono bardzo niskie u wszystkich prosiąt dzika i WBP i oscylowało wokół dolnej granicy czułości zestawu ELISA (ok. 2ng/ml). Niski poziom hepcydyny u wszystkich prosiąt doświadczalnych świadczy o tym, że regulacja metabolizmu żelaza ukierunkowana jest na maksymalne zwiększenie biodostępności żelaza dla procesu



Rycina 2. Poziom mRNA erytropoetyny (Epo) w nerkach i stężenie erytroferonu (Erfe) wosoczu krwi prosiąt dzika i prosiąt rasy WBP.

(A) Ekspresja erytropoetyny na poziomie mRNA w nerkach prosiąt. Transkrypt mierzono metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu specyficznych par starterów (Tab. 3). Amplikon białka rybosomalnego L4 (Rpl4) zastosowano jako kontrolę ilości cDNA użytego w reakcjach PCR. Każda kolumna reprezentuje średnie $\pm$ S.D. dwóch reakcji amplifikacji, przeprowadzonych przy użyciu pojedynczej próbki cDNA poddanej odwrotnej transkrypcji z RNA. (B) Stężenie erytroferonu w osoczu krwi prosiąt mierzone za pomocą zestawu (ELISA EPO ELISA Kit #ABIN6955643) według zaleceń produceta. a – b różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$.

erytropoezy. Czynnikiem wpływającym na zwiększenie syntezy hepcydyny w hepatocytach jest poziom żelaza w wątrobie (Nemeth and Ganz, 2009). Analiza poziomu żelaza, przeprowadzona zarówno poprzez bezpośredni pomiar zawartości żelaza niehemowego w wątrobie (Ryc. 1F, publikacja 2), jak i oznaczenie stężenia ferrytyny w osoczu krwi (Ryc. 1E, publikacja 2), wykazała niski poziom żelaza

zarówno u prosiąt dzika, jaki i u prosiąt WBP niezależnie od liczebności miotu, z którego pochodzą.

Wyniki te korelują z niskim stężeniem hepcydyny u badanych zwierząt i wskazują na oś regulatorową: żelazo w wątrobie-hepcydyna, jako na nadrzędny mechanizm utrzymujący niskie stężenie tego peptydu w osoczu krwi. W kontekście braku różnic w statusie żelaza prosiąt dzika i WBP (z wyjątkiem niższego poziomu żelaza w osoczu krwi prosiąt dzika) nasuwa się pytanie, dlaczego status czerwonekrwinkowy prosiąt dzika jest wyższy niż prosiąt WBP? Wydaje się, że kluczowym czynnikiem jest znaczna różnica w masie urodzeniowej potomstwa. Średnia masa urodzeniowa prosiąt dzika wynosi ok. 57% masy urodzeniowej prosiąt WBP (0,8 kg *versus* 1,4 kg; Ryc. 1H, publikacja 2). Wiąże się to ze znacznie mniejszym zapotrzebowaniem na żelazo potomstwa dzika. Porównywalna, u prosiąt dzika i świni WBP, podaż żelaza z zapasów zgromadzonych w wątrobie (główne źródło tego mikroelementu w okresie noworodkowym), w pełni odpowiada na potrzeby erytropoezy prosiąt dzika, jest natomiast niewystarczająca dla prosiąt WBP, co skutkuje występowaniem niedokrwistości.

Podobnie jak u prosiąt, status RBC był również znacznie wyższy u samic dzika w porównaniu do loch rasy WBP, w tym tych mających jedynie 4–6 prosiąt w miocie, co jest typową liczebnością dla miotów dzika (Chinn et al., 2022) (Ryc. 2A–C, publikacja 2). Jest mało prawdopodobne, aby wyższe wskaźniki RBC u samic dzika oznaczone około 24 godzin po porodzie wynikały z większej dostępności żelaza w diecie podczas ciąży. Należy wziąć pod uwagę, że zwierzęta te pozyskiwały żelazo głównie z gleby i ziarna kukurydzy, podczas gdy lochy rasy WBP otrzymywały paszę wzbogaconą w żelazo, zawierającą 120 mg Fe/kg w postaci $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Jest prawdopodobne, że wysoki status RBC samic dzika (nawet w porównaniu do loch rasy WBP z małymi miotami) wynika z mniejszego zapotrzebowania na żelazo ze względu na znacznie mniejszą masę ciała ich nowo narodzonych prosiąt oraz samych samic (średnia 60–70 kg dla dzika *versus* 90–110 kg dla WBP). Warto podkreślić, że mimo obniżonego statusu RBC u loszek rasy WBP we wszystkich grupach doświadczalnych, wartości wskaźników RBC mieściły się w granicach norm fizjologicznych i nie wskazywały na obecność IDA (Rys. 2A–C, publikacja 2). Zróznicowane wyniki mogą sugerować, że lochy dzika posiadają lepszą zdolność do mobilizacji i efektywnego

wykorzystania dostępnych zasobów żelaza, co pozwala na utrzymanie wyższego poziomu RBC nawet przy ograniczonym dostępie do żelaza w diecie.

W przeciwieństwie do prosiąt rasy WBP, liczebność miotu znacząco wpływała na podstawowe wskaźniki RBC loch tej rasy. Liczba erytrocytów, stężenie hemoglobiny oraz wartość hematokrytu były istotnie wyższe u loch mających małą liczbę prosiąt w miocie w porównaniu do loch z dużymi miotami, zwłaszcza tymi uzyskanymi w wyniku rutynowej sztucznej inseminacji (Ryc. 2A–C, publikacja 2). W tym kontekście warto zauważyć, że podczas ciąży regulacja metabolizmu żelaza jest przede wszystkim ukierunkowana na zaspokojenie potrzeb płodu kosztem potrzeb matki (Sangkhae i Nemeth, 2019). Niższy, chociaż nieanemiczny status RBC u loch posiadających duże mioty (co uwidacznia się szczególnie w przypadku dużych miotów uzyskanych w wyniku sztucznej inseminacji) jest odzwierciedleniem preferencyjnego transportu żelaza przez łożysko do licznych płodów z pomniejszeniem transportu tego mikroelementu do szpiku kostnego matki. Z uwagi na to, że zawartość żelaza w łożysku wykazywała tendencję zwyżkową u loch dzika w porównaniu do loch WBP, niezależnie od liczebności miotu (Ryc. 2G, publikacja 2), można przypuszczać, że przynajmniej transport żelaza do łożyska jest bardziej efektywny u dzików. Wartości żelazowych parametrów w osoczu krwi (poziom żelaza i stężenie ferrytyny), były zbliżone u samic dzika i samic rasy WBP (Rys. 2D–E, publikacja 2). Przypuszczalnie za utrzymanie tego statusu żelaza u loch rasy WBP odpowiada bardziej intensywne niż u loch dzika wchłaniania żelaza z diety oraz bardziej efektywne jego uwalnianie przez makrofagi tkankowe. Nasilenie obu tych procesów jest bezpośrednio związane ze znacznie niższym stężeniem hepcydyny w osoczu krwi loch rasy WBP w porównaniu do samic dzika (Ryc. 2F, publikacja 2). Porównywalny status żelazowy samic dzika i samic rasy WBP we wszystkich grupach doświadczalnych znajduje również odzwierciedlenie w podobnej zawartości żelaza w siarze (Ryc. 2H, publikacja 2).

Zgodnie z hipotezą leżącą u podstaw moich badań nad niedokrwistością z niedoboru żelaza (IDA) u prosiąt rasy WBP zawartych w publikacji 2, mniejsza liczba prosiąt w miocie mogłaby zwiększyć dostępność żelaza dla każdego osobnika, a tym samym zmniejszyć ryzyko rozwoju IDA. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały jednak, że niezależnie od liczebności miotu (od 4 do 14 zwierząt), prosięta rasy WBP prezentowały podobne wartości parametrów RBC, wskazujące na występowanie niedokrwistości z niedoboru żelaza. Wyniki te przeczą początkowej hipotezie i

sugerują, że liczba prosiąt w miocie nie jest kluczowym czynnikiem determinującym tę patologię. Istotną przyczyną może być natomiast o blisko 50% wyższa masa urodzeniowa prosiąt WBP w porównaniu do nieanemicznych prosiąt dzika. Masa ciała (większa objętość krwi) wpływa niewątpliwie na wzrost zapotrzebowania na żelazo, chociaż jego wielkość jest trudna do oszacowania. Następnie podjęłam próbę zbadania, czy niska efektywność transportu żelaza przez łożysko może być dodatkowym czynnikiem wywołującym IDA u prosiąt WBP. Badania przeprowadziłam w tym samym układzie grup doświadczalnych obejmującym dziki i świnię WBP o zróżnicowanej wielkości miotu.

W drugiej części moich badań przeprowadziłam analizę porównawczą transkryptomu (analizę RNA-seq) łożyska loch dzika i loszek WBP o zróżnicowanej liczbie prosiąt w miocie, której pierwszorzędnym celem było wyłonienie różnic w ekspresji genów uczestniczących w transporcie żelaza przez łożysko i genów regulujących ten proces (Kopeć et al., 2024b). W konsekwencji, ostatecznym celem było sprawdzenie, czy odnotowane w publikacji nr. 2 różnice w statusie żelaza między prosiętami dzika i prosiętami WBP mogą być pochodną zróżnicowanego molekularnego potencjału transferu żelaza od matki do płodów. W analizie wzięto pod uwagę geny, w ekspresji których stwierdzono co najmniej pięciokrotną różnicę między dzikiem a świnią rasy WBP z poszczególnych grup doświadczalnych (Rycina uzupełniająca S1A-F, publikacja 3). W tej globalnej analizie porównawczej uderza mała liczba genów (pojedyncze geny), których ekspresja w łożysku różni się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami świni WBP (Tabela 1, publikacja 3). Świadczy to tym, że liczba prosiąt w miocie nie wpływa na zmianę ekspresji genów w łożysku, w tym genów związanych z metabolizmem żelaza. Odnotowano natomiast znacznie większą liczbę genów (od 82 do 402) różniących się ekspresją pomiędzy dzikiem a świnią WBP z poszczególnych grup doświadczalnych (Tabela 1, publikacja 3). Jest to prawdopodobnie efekt intensywnej pracy hodowlanej prowadzonej przez hodowców na przestrzeni wielu dziesiątek lat.

Nieoczekiwanie, analiza RNA-seq nie wykazała różnic między grupami doświadczalnymi w ekspresji genów kodujących główne białka transportujące żelazo przez łożysko oraz białka regulatorowe. Brak różnic w ekspresji TfR1, Fpn i podjednostki L ferrytyny, dodatkowo, potwierdziłam technikami RT-PCR i Western blot (odpowiednio Ryc. 1D, 1B i 1A, publikacja 3). Stwierdziłam natomiast, że

ekspresja Dmt1 na poziomie białka jest wyższa w łożysku dzika w porównaniu do łożyska świni WBP niezależnie od wielkości miotu (Ryc. 1C, publikacja 3). Wyższa ekspresja Dmt1, białka uczestniczącego wraz z TfR1 w transporcie żelaza z krwioobiegu matki do łożyska, może oznaczać bardziej efektywne pobieranie żelaza u dzików z matczynej holo-transferryiny.

Ważnym wynikiem uzyskanym dzięki analizie RNA-seq jest wykazanie statystycznie istotnego wzrostu ekspresji w łożysku dzika w porównaniu do łożyska świni domowej genów: *Heph11*, *Cp*, i *Heph* kodujących miedziozależne ferroksydazy, odpowiednio: cyklopen (*Zp*), cerulopazminę (*Cp*) i hefajstynę (*Heph*). Wartości $\log_2\text{FoldChange}$ dla tych genów są silnie zwiększone w łożyskach loch dzików w porównaniu z łożyskami samic WBP, niezależnie od wielkości miotu. Odpowiednie wartości $\log_2\text{FoldChange}$ i skorygowaną wartość P (*padj*) dla wszystkich trzech badanych genów przedstawiono w Tabeli 2 (Tabela 2, publikacja 3). Różnice te potwierdziłam analizą RT-PCR czasami pisze pani RT-PCR a czasami RT-qPCR, trzeba to ujednolicić (Ryc. 2A-C, publikacja 3). Nie stwierdziłam jedynie statystycznie istotnej różnicy w poziomach mRNA *Cp* między łożyskiem dzika i łożyskiem świń WBP, mających duże mioty uzyskane po transferze zarodków (Ryc. 2A, publikacja 3). Jednocześnie nie wykazałam istotnych statystycznie różnic w ekspresji tych genów pomiędzy świnią WBP z poszczególnych grup doświadczalnych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że wysoka ekspresja genów ferroksydazowych w łożysku dzika, przodka świni domowej uległa istotnemu obniżeniu w łożyskach samic WBP, chociaż przyczyny tego zjawiska są nieznane. Nasuwa się sugestia, że wyższa ekspresja ferroksydaz w łożysku dzika może przyczyniać się do bardziej efektywnego transportu żelaza z łożyska do płodowego krwioobiegu. Ferroksydazy są bowiem enzymami występującymi na błonie komórkowej, odgrywającymi kluczową rolę w procesie uwalniania żelaza z komórek różnych typów (Lane et al., 2015). Katalizują one reakcję utleniania jonów żelazawych (Fe^{2+}) do jonów żelazowych (Fe^{3+}), dzięki czemu po przetransportowaniu do środowiska zewnątrzkomórkowego przez Fpn, mogą one być przyłączone do transferryiny (Lane et al., 2015). Przed wyciągnięciem ostatecznego wniosku, co do znaczenia wyższego poziomu mRNA ferroksydaz w łożysku dzika, postanowiłam określić ich ekspresję na poziomie białka metodą Western blot oraz ich lokalizację w łożysku poprzez detekcję immunofluorescencyjną (IF) i analizę przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Analiza Western blot powiodła się jedynie w

przypadku detekcji Cp wykonanej na bazie łożyskowych ekstraktów błonowych (Ryc. 4I, publikacja 3). Obserwowałam wyraźną tendencję do wyższego poziomu białka Cp w łożysku loch dzika w porównaniu do loch WBP, przy czym różnica między łożyskiem loch dzika a łożyskiem świń WBP o dużych miotach uzyskanych w wyniku sztucznej inseminacji była statystycznie istotna (Ryc. 4I, publikacja 3). W przypadku dwóch pozostałych ferroksoydaz detekcja nie powiodła się (przyczyną mogła być mała specyficzność przeciwciał lub zbyt niskie stężenie białka w ekstraktach błonowych).

Ponieważ jony miedzi mogą regulować ekspresję i aktywność enzymatyczną miedziozależnych ferroksoydaz (Prohaska, 2011), przystąpiłam do pomiaru i porównania poziomów tego mikroelementu w łożyskach we wszystkich grupach doświadczalnych. Założyłam, że podwyższony poziom miedzi w łożyskach dzików może być przyczyną zwiększonej ekspresji badanych ferroksoydaz. Wbrew tej hipotezie zawartość miedzi w łożyskach loch dzików i loszek WBP, niezależnie od wielkości miotu, była niemal identyczna (Ryc. 2A, publikacja 3). Postanowiłam również sprawdzić, czy większa ekspresja genów ferroksoydazowych w łożysku dzika występuje również w przypadku genów kodujących inne enzymy zawierające miedź w swoich centrach aktywnych. Przeanalizowałam ekspresję genu dysmutazy ponadtlenkowej 1 (*Sod1*), enzymu antyoksydacyjnego (Trist et al., 2021), oraz genów *Atp7a* i *Atp7b*, kodujących dwie ATPaz typu P, które odgrywają kluczowe, ale różne role w metabolizmie miedzi (La Fontaine et al., 2010). Nie stwierdziłam znaczących różnic w ekspresji mRNA *Sod1* ani *Atp7a* między grupami doświadczalnymi (Ryc. 3D i 3C, publikacja 3). Co ciekawe, ekspresja genu *Atp7b* była istotnie wyższa w łożyskach loch dzików w porównaniu do łożysk loch WBP z małymi miotami po transferze zarodków oraz około trzykrotnie wyższa (choć różnica nie była statystycznie istotna) w porównaniu do loch z dużymi miotami po transferze zarodków (Figura 3B, publikacja 3). Jest to obserwacja o tyle interesująca, że białko *Atp7b* uczestniczy we włączaniu jonów miedzi do apo-Cp (Lutsenko et al., 2007), co prowadzi do utworzenia aktywnego holo-enzymu, który charakteryzuje się większą stabilnością w porównaniu do apo-Cp. Wysoki poziom ekspresji zarówno genu *Cp*, jak i genu *Atp7b* sugeruje, że Cp pełni istotną rolę w łożyskach dzików.

Kolejnych dowodów wskazujących na Cp, jako na główną ferroksoydazę w łożysku dzików i świń WBP dostarcza analiza IF (Ryc. 4A-H, publikacja 3). Zarówno u dzików, jak i świń domowych, Cp zlokalizowano w części matczynej łożyska, na błonie

apikalnej komórek nabłonkowych endometrium (Ryc. 4A-D, publikacja 3). Szczególnie silny sygnał IF dla Cp zaobserwowałam w łożyskach samic dzików (Ryc. 4A, publikacja 3). Dodatkowo na podstawie przeprowadzonej kolokalizacji Cp i Fpn (Ryc. 4E-H, publikacja 3), stwierdziłam, że oba białka występują na błonie apikalnej komórek nabłonkowych endometrium. Ścisła kolokalizacja Cp i Fpn silnie sugeruje funkcjonalną interakcję między tymi białkami, która jest niezbędna dla efektywnego transportu żelaza przez błony komórkowe do środowiska zewnątrzkomórkowego. Warto zaznaczyć, że Cp występująca na błonie komórkowej jest kodowana przez jeden z dwóch mRNA transkrybowanych na bazie jednego genu na drodze alternatywnego splicingu (Yang et al., 1990). Ten wariant splicingowy białka posiada w końcu C glikolipid – glikozylofosfatydylinozytol (ang. *glycosylphosphatidylinositol*, GPI), poprzez który Cp jest zakotwiczona na błonie komórkowej (Patel et al., 2000). Wykazano że aktywność ferooksydazowa Cp-GPI wpływa na stabilność Fpn na błonie komórkowej i podtrzymuje funkcje Fpn jako eksportera żelaza (De Domenico et al., 2007). Chociaż obecność Cp-GPI stwierdzono w łożysku człowieka (Guller et al., 2008) i gryzoni (Danzeisen et al., 2002), to jednak uważa się, że Cp-GPI uczestniczy w uwalnianiu żelaza głównie z wątroby (Harris, 2003) i mózgu (Jeong and David, 2003). Wykazano również, że Cp-GPI nie jest niezbędna do przepływu żelaza z łożyska do mysich płodów (Leah Harris et al., 1999) Według mojej najlepszej wiedzy w niniejszej pracy po raz pierwszy udokumentowałam silną ekspresję Cp w łożysku przedstawicieli rodziny świniowatych (*Suidae*), co sugeruje jej udział w transporcie żelaza z łożyska do płodów.

Cyklopen (ang. *zyklopen*, Zp) zidentyfikowano jako główną ferooksydazę w łożysku myszy i stwierdzono, że wykazuje wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej w stosunku do Cp i Heph (Chen et al., 2010). Z czasem wykazano, że u myszy Zp nie jest niezbędny do transportu żelaza z łożyska do płodów i że jest głównie zlokalizowany w doczesnej (Helman et al., 2021). W moich badaniach stwierdziłam metodą IF występowanie Zp na apikalnej błonie komórek nabłonkowych części macicznej łożyska samic dzików oraz loszek WBP ze wszystkich grup doświadczalnych (Ryc. 5A-D, publikacja 3). Ponadto, podobnie jak w przypadku Cp, potwierdziłam kolokalizację Zp i Fpn (Ryc. 5A-D, publikacja 3), wskazującą na rolę Zp jako ferooksydazy współpracującej z Fpn w transporcie żelaza z łożyska do płodów. Dodatkowo, w grupach dzików i świni WBP zaobserwowałam ekspresję białka Zp w

jądrach komórek nabłonkowych endometrium (barwienie DAPI), znajdujących się wyłącznie w podstawnej części kosmków łożyskowych (Ryc. 5D i 5I, publikacja 3). Zgodnie z wcześniejszą sugestią (Planque, 2006) lokalizacja ta może oznaczać udział Zp w proliferacji komórek.

Kolejną ferroksydazą analizowaną w łożysku dzika i świni WBP była hefajstyna (Heph). Jest to ferroksydaza, która wspólnie z Fpn uczestniczy głównie w transporcie żelaza z enterocytów absorpcyjnych dwunastnicy do krwi. Mutacja w genie *Heph* u myszy skutkuje niedokrwistością (ang. *sex-linked anemia*, *X-linked anemia*) i akumulacją żelaza w enterocytach (Vulpe et al., 1999). Ekspresję genu *Heph* stwierdzono również w łożysku (Cao and Fleming, 2016). Analiza IF wykazała sygnał Heph jedynie w niektórych komórkach nabłonkowych endometrium (matczyna część łożyska), zarówno u dzików, jak i u świń WBP z różnych grup doświadczalnych (Ryc. 6A-H, publikacja 3). W przeciwieństwie do Cp i Zp, ekspresję Heph stwierdziłam na błonie podstawnej komórek nabłonkowych endometrium. Tylko w łożysku dzików niektóre komórki nabłonkowe wykazywały kolokalizację Heph z Fpn. Interakcja Fpn-Heph nie występowała u świń WBP z żadnej z grup doświadczalnych. Wyniki te wskazują, że Heph nie jest ferroksydazą aktywną w transporcie żelaza z łożyska do płodów u dzika i świni WBP.

Celem badań, których wyniki zawarłam w publikacji nr. 3, było sprawdzenie czy różnice w statusie RBC (publikacja nr. 2) można uzasadnić w oparciu o różną efektywność transportu żelaza przez łożysko. Wszechstronna analiza ekspresji genów determinujących ten proces wskazuje, że jest ona podobna w łożyskach dzików i świni WBP. Co prawda, w łożysku dzika wykazano wyższą ekspresję Cp (na poziomie mRNA i białka), ale nie wydaje się jednak, żeby różnica ta decydowała o większym transporcie żelaza z łożyska dzika. Przy wyższym poziomie białka Cp i wyrównanym poziomie Fpn w tandemie Fpn-Cp, to Fpn jako eksporter żelaza jest czynnikiem limitującym wpływ żelaza z łożyska. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku wyższej ekspresji *Dmt1* w łożysku dzika i wyrównanej ekspresji *TfR1*. Receptor ten jest czynnikiem limitującym dostarczanie żelaza do komórek łożyska na drodze endocytozy, które następnie *Dmt1* transportuje z endosomu do cytoplazmy (Bastin et al., 2006; Cao and Fleming, 2021, 2016; Chong et al., 2005). Wydaje się, że wydajność molekularnej maszynarii transferu żelaza przez łożysko świni domowej pozostaje na poziomie ustalonym w toku ewolucji u dzika, jest dostosowana do zaspokojenia potrzeb małej

liczby potomstwa o niższej masie ciała i ma na celu ograniczenia toksyczności żelaza. Pojawienia się we krwi płodów toksycznej frakcji żelaza niezwiązanego z transferyną (ang. *non-transferrin-bound iron*, NTBI) (Angoro et al., 2022), mogłoby okazać się dla nich szczególnie niebezpieczne. W tym kontekście warto zauważyć, że suplementacja ciężarnych loch świni domowej różnymi związkami żelaza nie wpływa na zwiększenie transportu przez łożysko i poprawę statusu RBC i statusu żelazowego prosiąt. Okres ostatnich ok. 100 lat, w którym, dzięki selekcji w hodowli trzody chlewnej, nastąpiła poprawa cech produkcyjnych (w tym cech użytkowości rozrodczej), jest zbyt krótki na odpowiednie dostosowanie się mechanizmów związanych z utrzymaniem homeostazy żelaza.

6. Wnioski

1. Liczebność miotów loch rasy Wielka Biała Polska (WBP) nie wpływa na status czerwonokrwinkowy i status żelaza noworodków, które jednoznacznie wskazują na niedokrwistość z niedoboru żelaza.
2. U noworodków dzika nie występuje niedokrwistość z niedoboru żelaza.
3. Prawdopodobną przyczyną niedokrwistości z niedoboru żelaza występującej u prosiąt rasy WBP jest o około 50% wyższa masa urodzeniowa prosiąt WBP w porównaniu do prosiąt dzika, która wiąże się ze znacznie większym zapotrzebowaniem na żelazo.
4. Nie występują istotne różnice w ekspresji genów kodujących główne białka uczestniczące w transporcie żelaza przez łożysko pomiędzy lochami dzika i lochami rasy WBP (bez względu na liczebność ich miotów), co wskazuje na podobną intensywność transportu żelaza przez łożyska.
5. Spośród trzech znanych ferroksydaz, ceruloplazmina może odgrywać wiodącą rolę u badanych w pracy przedstawicieli rodziny świniowatych (*Suidae*) w transporcie żelaza z łożyska do płodów.

7. Bibliografia

1. Al Hasan, S.M., Hassan, M., Saha, S., Islam, M., Billah, M., Islam, S., 2016. Dietary phytate intake inhibits the bioavailability of iron and calcium in the diets of pregnant women in rural Bangladesh: a cross-sectional study. *BMC Nutrition* 2, 24. <https://doi.org/10.1186/s40795-016-0064-8>
2. Allen, L.H., 2000. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 71, 1280S–4S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1280s>
3. Almeida, F.R.C.L., Dias, A.L.N.A., 2022. Pregnancy in pigs: the journey of an early life. *Domestic Animal Endocrinology* 78, 106656. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106656>
4. Anderson, G.J., Vulpe, C.D., 2009. Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci* 66, 3241–3261. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0051-1>
5. Angoro, B., Motshakeri, M., Hemmaway, C., Svirskis, D., Sharma, M., 2022. Non-transferrin bound iron. *Clin Chim Acta* 531, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.04.004>
6. Balesaria, S., Hanif, R., Salama, M.F., Raja, K., Bayele, H.K., McArdle, H., Srail, S.K.S., 2012. Fetal iron levels are regulated by maternal and fetal Hfe genotype and dietary iron. *Haematologica* 97, 661–669. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.055046>
7. Bastin, J., Drakesmith, H., Rees, M., Sargent, I., Townsend, A., 2006. Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *British Journal of Haematology* 134, 532–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06216.x>
8. Baxter, E., Rutherford, K., D'Eath, R., Arnott, G., Turner, S., SandØe, P., Moustsen, V., Thorup, F., Edwards, S., Lawrence, A., 2013. The welfare implications of large litter size in the domestic pig II: management factors. *Anim. welf.* 22, 219–238. <https://doi.org/10.7120/09627286.22.2.219>
9. Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
10. Bernhardt, W.M., Schmitt, R., Rosenberger, C., Münchenhagen, P.M., Gröne, H.-J., Frei, U., Warnecke, C., Bachmann, S., Wiesener, M.S., Willam, C., Eckardt, K.-U., 2006. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney International* 69, 114–122. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000062>
11. Björkman, S., Oliviero, C., Rajala-Schultz, P.J., Soede, N.M., Peltoniemi, O. a. T., 2017. The effect of litter size, parity and farrowing duration on placenta expulsion and retention in sows. *Theriogenology* 92, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.003>
12. 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, 185–192. <https://doi.org/10.1139/y07-007>

13. 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. <https://doi.org/10.2527/jas1978.4751135x>
14. Braude, R., 1967. The effect of changes in feeding patterns on the performance of pigs. *Proceedings of the Nutrition Society* 26, 163–181. <https://doi.org/10.1079/PNS19670034>
15. Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C., Loréal, O., 2012. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1820, 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.014>
16. Cabantchik, Z.I., Kakhlon, O., Epsztejn, S., Zanninelli, G., Breuer, W., 2002. Intracellular and Extracellular Labile Iron Pools, in: Hershko, C. (Ed.), *Iron Chelation Therapy, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, Boston, MA, pp. 55–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0593-8_4
17. Camaschella, C., Nai, A., Silvestri, L., 2020. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica* 105, 260–272. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232124>
18. Cantarelli, C., Angeletti, A., Cravedi, P., 2019. Erythropoietin, a multifaceted protein with innate and adaptive immune modulatory activity. *Am J Transplant* 19, 2407–2414. <https://doi.org/10.1111/ajt.15369>
19. Cao, C., Fleming, M.D., 2021. Localization and Kinetics of the Transferrin-Dependent Iron Transport Machinery in the Mouse Placenta. *Curr Dev Nutr* 5, nzab025. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab025>
20. Cao, C., Fleming, M.D., 2016. The placenta: the forgotten essential organ of iron transport. *Nutr Rev* 74, 421–431. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw009>
21. Cao, C., Thomas, C.E., Insogna, K.L., O'Brien, K.O., 2014. Duodenal Absorption and Tissue Utilization of Dietary Heme and Nonheme Iron Differ in Rats. *J Nutr* 144, 1710–1717. <https://doi.org/10.3945/jn.114.197939>
22. Chen, H., Attieh, Z.K., Syed, B.A., Kuo, Y.-M., Stevens, V., Fuqua, B.K., Andersen, H.S., Naylor, C.E., Evans, R.W., Gambling, L., Danzeisen, R., Bacouri-Haidar, M., Usta, J., Vulpe, C.D., McArdle, H.J., 2010. Identification of Zyklopen, a New Member of the Vertebrate Multicopper Ferroxidase Family, and Characterization in Rodents and Human Cells. *The Journal of Nutrition* 140, 1728–1735. <https://doi.org/10.3945/jn.109.117531>
23. Chinn, S.M., Schlichting, P.E., Smyser, T.J., Bowden, C.F., Beasley, J.C., 2022. Factors influencing pregnancy, litter size, and reproductive parameters of invasive wild pigs. *The Journal of Wildlife Management* 86, e22304. <https://doi.org/10.1002/jwmg.22304>
24. Chong, W.S., Kwan, P.C., Chan, L.Y., Chiu, P.Y., Cheung, T.K., Lau, T.K., 2005. Expression of divalent metal transporter 1 (DMT1) isoforms in first trimester human placenta and embryonic tissues. *Hum Reprod* 20, 3532–3538. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei246>
25. Danzeisen, R., Fosset, C., Chariana, Z., Page, K., David, S., McArdle, H.J., 2002. Placental ceruloplasmin homolog is regulated by iron and copper and is implicated in iron metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282, C472–C478. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00019.2001>
26. De Domenico, I., Ward, D.M., di Patti, M.C.B., Jeong, S.Y., David, S., Musci, G., Kaplan, J., 2007. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface

- ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *The EMBO Journal* 26, 2823–2831. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601735>
27. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
28. Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C., 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 1, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003>
29. Dutt, S., Hamza, I., Bartnikas, T.B., 2022. Molecular Mechanisms of Iron and Heme Metabolism. *Annual Review of Nutrition* 42, 311–335. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-062320-112625>
30. Duvigneau, J.C., Esterbauer, H., Kozlov, A.V., 2019. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants* 8, 475. <https://doi.org/10.3390/antiox8100475>
31. Egeli, A.K., Framstad, T., Morberg, H., 1998a. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Vet Scand* 39, 381–393. <https://doi.org/10.1186/BF03547786>
32. Egeli, A.K., Framstad, T., Morberg, H., 1998b. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Vet Scand* 39, 381–393. <https://doi.org/10.1186/BF03547786>
33. Engelmann, M.D., Davidsson, L., Sandström, B., Walczyk, T., Hurrell, R.F., Michaelsen, K.F., 1998. The influence of meat on nonheme iron absorption in infants. *Pediatr Res* 43, 768–773. <https://doi.org/10.1203/00006450-199806000-00009>
34. Fernández-Llario, P., Mateos-Quesada, P., 1998. Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriol.* 43, 439–444. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.98-54>
35. Fraser, S.T., Midwinter, R.G., Berger, B.S., Stocker, R., 2011. Heme Oxygenase-1: A Critical Link between Iron Metabolism, Erythropoiesis, and Development. *Advances in Hematology* 2011, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2011/473709>
36. Fryer, A.A., Jones, P., Strange, R., Hume, R., Bell, J.E., 1993. Plasma protein levels in normal human fetuses: 13 to 41 weeks' gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 100, 850–855. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1993.tb14313.x>
37. Fuqua, B., Lu, Y., Darshan, D., Frazer, D., Wilkins, S., Page, K., Vulpe, C., Anderson, G., 2014. The role of multicopper ferroxidases in mammalian iron homeostasis. *The FASEB Journal* 28. https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.995.2
38. Fuqua, B.K., Lu, Y., Darshan, D., Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Wolkow, N., Bell, A.G., Hsu, J., Yu, C.C., Chen, H., Dunaief, J.L., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., 2014. The Multicopper Ferroxidase Hephaestin Enhances Intestinal Iron Absorption in Mice. *PLoS ONE* 9, e98792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098792>
39. Gambling, L., Lang, C., McArdle, H.J., 2011. Fetal regulation of iron transport during pregnancy. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94, S1903–S1907. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000885>

40. Gao, G., Liu, S.-Y., Wang, H.-J., Zhang, T.-W., Yu, P., Duan, X.-L., Zhao, S.-E., Chang, Y.-Z., 2015. Effects of Pregnancy and Lactation on Iron Metabolism in Rats. *Biomed Res Int* 2015, 105325. <https://doi.org/10.1155/2015/105325>
41. GBD 2021 Anaemia Collaborators, 2023. Prevalence, years lived with disability, and trends in anaemia burden by severity and cause, 1990–2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Haematol* 10, e713–e734. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(23\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(23)00160-6)
42. Gomme, P.T., McCann, K.B., Bertolini, J., 2005. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 10, 267–273. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03333-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03333-1)
43. Gulec, S., Anderson, G.J., Collins, J.F., 2014. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 307, G397–G409. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00348.2013>
44. Guller, S., Buhimschi, C.S., Ma, Y.Y., Huang, S.T.J., Yang, L., Kuczynski, E., Zambrano, E., Lockwood, C.J., Buhimschi, I.A., 2008. Placental expression of ceruloplasmin in pregnancies complicated by severe preeclampsia. *Laboratory Investigation* 88, 1057–1067. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.74>
45. Hahn, P., Qian, Y., Dentchev, T., Chen, L., Beard, J., Harris, Z.L., Dunaief, J.L., 2004. Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13850–13855. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405146101>
46. Hallberg, L., Rossander, L., Skånberg, A.B., 1987. Phytates and the inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am J Clin Nutr* 45, 988–996. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.5.988>
47. Harris, Z.L., 2003. Aceruloplasminemia. *Journal of the Neurological Sciences* 207, 108–109. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(02\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00434-3)
48. Harris, Z. L., Durley, A.P., Man, T.K., Gitlin, J.D., 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10812–10817. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10812>
49. Harris, Z. Leah, Durley, A.P., Man, T.K., Gitlin, J.D., 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10812–10817.
50. Harrison, P.M., Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1275, 161–203. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00022-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00022-9)
51. Helman, S.L., Wilkins, S.J., McKeating, D.R., Perkins, A.V., Whibley, P.E., Cuffe, J.S.M., Simmons, D.G., Fuqua, B.K., Vulpe, C.D., Wallace, D.F., O’Callaghan, J.L., Pelzer, E.S., Anderson, G.J., Frazer, D.M., 2021. The Placental Ferroxidase Zyklopen Is Not Essential for Iron Transport to the Fetus in Mice. *J Nutr* 151, 2541–2550. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab174>
52. Helman, S.L., Zhou, J., Fuqua, B.K., Lu, Y., Collins, J.F., Chen, H., Vulpe, C.D., Anderson, G.J., Frazer, D.M., 2023. The biology of mammalian multi-copper ferroxidases. *Biometals* 36, 263–281. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00370-z>
53. Hubbard, A.C., Bandyopadhyay, S., Wojczyk, B.S., Spitalnik, S.L., Hod, E.A., Prestia, K.A., 2013. Effect of dietary iron on fetal growth in pregnant mice. *Comp Med* 63, 127–135.

54. Jeong, S.Y., David, S., 2003. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* 278, 27144–27148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301988200>
55. Jiang, H., Lei, R., Ding, S.-W., Zhu, S., 2014. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics* 15, 182. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-182>
56. Jin, H.-X., Wang, R.-S., Chen, S.-J., Wang, A.-P., Liu, X.-Y., 2015. Early and late Iron supplementation for low birth weight infants: a meta-analysis. *Italian Journal of Pediatrics* 41, 16. <https://doi.org/10.1186/s13052-015-0121-y>
57. Johnston, K.L., Johnson, D.M., Marks, J., Srai, S.K., Debnam, E.S., Sharp, P.A., 2006. Non-haem iron transport in the rat proximal colon. *Eur J Clin Invest* 36, 35–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01585.x>
58. Jordan, J.B., Poppe, L., Haniu, M., Arvedson, T., Syed, R., Li, V., Kohno, H., Kim, H., Schnier, P.D., Harvey, T.S., Miranda, L.P., Cheetham, J., Sasu, B.J., 2009. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem* 284, 24155–24167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017764>
59. Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I., 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* 33, 1037–1046. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01006-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01006-7)
60. Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2013. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Research* 44, 95. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-95>
61. Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E., Ganz, T., 2014a. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 46, 678–684. <https://doi.org/10.1038/ng.2996>
62. Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E., Ganz, T., 2014b. IDENTIFICATION OF ERYTHROFERRONE AS AN ERYTHROID REGULATOR OF IRON METABOLISM. *Nat Genet* 46, 678–684. <https://doi.org/10.1038/ng.2996>
63. Kegley, E., Spears, J., Flowers, W., Schoenherr, W., 2002a. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig 1 1 Use of trade names in this publication does not imply endorsement by the North Carolina ARS or criticism of similar products not mentioned. *Nutrition Research - NUTR RES* 22, 1209–1217.
64. Kegley, E., Spears, J., Flowers, W., Schoenherr, W., 2002b. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig 1 1 Use of trade names in this publication does not imply endorsement by the North Carolina ARS or criticism of similar products not mentioned. *Nutrition Research - NUTR RES* 22, 1209–1217.
65. Kemp, B., Da Silva, C.L.A., Soede, N.M., 2018. Recent advances in pig reproduction: Focus on impact of genetic selection for female fertility. *Reprod Domest Anim* 53 Suppl 2, 28–36. <https://doi.org/10.1111/rda.13264>
66. Kenawi, M., Rouger, E., Island, M., Leroyer, P., Robin, F., Rémy, S., Tesson, L., Anegón, I., Nay, K., Derbré, F., Brissot, P., Ropert, M., Cavey, T., Loréal, O., 2019. Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload: lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia. *The FASEB Journal* 33, 13492–13502. <https://doi.org/10.1096/fj.201901106R>

67. Khan, A.A., Quigley, J.G., 2013. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol Aspects Med* 34, 669–682.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.013>
68. Kim, J.C., Wilcock, P., Bedford, M.R., 2018. Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review. *Animal Feed Science and Technology* 235, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.001>
69. Kopeć, Z., Mazgaj, R., Starzyński, R.R., Wang, X., Opiela, J., Smorąg, Z., Gajda, B., Nicpoń, J., Lenartowicz, M., Ogłuszka, M., Gralak, M.A., Lipiński, P., 2024a. Impact of litter size on the hematological and iron status of gilts, sows and newborn piglets: a comparative study of domestic pigs and wild boars. *BMC Vet Res* 20, 64. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03905-3>
70. Kopeć, Z., Starzyński, R.R., Lenartowicz, M., Grzesiak, M., Opiela, J., Smorąg, Z., Gajda, B., Nicpoń, J., Ogłuszka, M., Wang, X., Mazgaj, R., Stankiewicz, A., Płonka, W., Pirga-Niemiec, N., Herman, S., Lipiński, P., 2024b. Comparison of Molecular Potential for Iron Transfer across the Placenta in Domestic Pigs with Varied Litter Sizes and Wild Boars. *Int J Mol Sci* 25, 9638. <https://doi.org/10.3390/ijms25179638>
71. La Fontaine, S., Ackland, M.L., Mercer, J.F.B., 2010. Mammalian copper-transporting P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B: Emerging roles. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.007>
72. Lane, Darius J. R., Bae, D.-H., Merlot, A.M., Sahni, S., Richardson, D.R., 2015. Duodenal Cytochrome b (DCYTB) in Iron Metabolism: An Update on Function and Regulation. *Nutrients* 7, 2274–2296. <https://doi.org/10.3390/nu7042274>
73. Lane, D. J. R., Merlot, A.M., Huang, M.L.-H., Bae, D.-H., Jansson, P.J., Sahni, S., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., 2015. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1130–1144. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.021>
74. Larson, J.A., Howie, H.L., So, M., 2004. *Neisseria meningitidis* accelerates ferritin degradation in host epithelial cells to yield an essential iron source. *Mol Microbiol* 53, 807–820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04169.x>
75. Lasocki, S., Gaillard, T., Rineau, E., 2014. Iron is essential for living! *Crit Care* 18, 678. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0678-7>
76. Leverence, R., Mason, A.B., Kaltashov, I.A., 2010. Noncanonical interactions between serum transferrin and transferrin receptor evaluated with electrospray ionization mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8123–8128. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914898107>
77. Lipinski, 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, 1233–1243. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091020>
78. 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. *The American Journal of Pathology* 177, 1233–1243. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091020>

79. Liu, Z., Wang, M., Zhang, C., Zhou, S., Ji, G., 2022. Molecular Functions of Ceruloplasmin in Metabolic Disease Pathology. *Diabetes Metab Syndr Obes* 15, 695–711. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S346648>
80. Long, H., Yi, J.-M., Hu, P.-L., Li, Z.-B., Qiu, W.-Y., Wang, F., Zhu, S., 2012. Benefits of iron supplementation for low birth weight infants: a systematic review. *BMC Pediatr* 12, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-12-99>
81. Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
82. Lundström, U., Siimes, M.A., Dallman, P.R., 1977. At what age does iron supplementation become necessary in low-birth-weight infants? *J Pediatr* 91, 878–883. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(77\)80881-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(77)80881-0)
83. Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., Dmitriev, O.Y., 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 87, 1011–1046. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2006>
84. Mackenzie, B., Garrick, M.D., 2005. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G981–986. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00363.2005>
85. Marchi, G., Busti, F., Lira Zidanes, A., Castagna, A., Girelli, D., 2019. Aceruloplasminemia: A Severe Neurodegenerative Disorder Deserving an Early Diagnosis. *Front Neurosci* 13, 325. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00325>
86. Mayle, K.M., Le, A.M., Kamei, D.T., 2012. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochim Biophys Acta* 1820, 264–281. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.009>
87. Mazgaj, R., Szudzik, M., Lipiński, P., Jończy, A., Smuda, E., Kamyczek, M., Cieślak, B., Swinkels, D., Lenartowicz, M., 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. <https://doi.org/10.3390/ani10071113>
88. McGovan, J.P., Crichton, A., 1924. Iron deficiency in pigs. *Biochemical Journal* 18, 265–272.
89. McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaneh, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., Simpson, R.J., 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5, 299–309. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80425-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80425-6)
90. Mégier, C., Peoc'h, K., Puy, V., Cordier, A.-G., 2022. Iron Metabolism in Normal and Pathological Pregnancies and Fetal Consequences. *Metabolites* 12, 129. <https://doi.org/10.3390/metabo12020129>
91. Mehlhase, J., Sandig, G., Pantopoulos, K., Grune, T., 2005. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic Biol Med* 38, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.025>
92. Minotti, G., Aust, S.D., 1989. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 71, 1–19. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(89\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0009-2797(89)90087-2)
93. Muckenthaler, M., Gray, N.K., Hentze, M.W., 1998. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding

- complex eIF4F. *Mol Cell* 2, 383–388. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80282-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80282-8)
94. Muckenthaler, M.U., Rivella, S., Hentze, M.W., Galy, B., 2017. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* 168, 344–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034>
 95. Nemeth, E., Ganz, T., 2021. Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *Int J Mol Sci* 22, 6493. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
 96. Nemeth, E., Ganz, T., 2009. The Role of Hepcidin in Iron Metabolism. *Acta Haematol* 122, 78–86. <https://doi.org/10.1159/000243791>
 97. Nowak, B., Mucha, A., Moska, M., Kruszyński, W., 2020. Reproduction Indicators Related to Litter Size and Reproduction Cycle Length Among Sows of Breeds Considered Maternal and Paternal Components Kept on Medium-Size Farms. *Animals (Basel)* 10, 1164. <https://doi.org/10.3390/ani10071164>
 98. Oliviero, C., 2023. Offspring of hyper prolific sows: Immunity, birthweight, and heterogeneous litters. *Mol Reprod Dev* 90, 580–584. <https://doi.org/10.1002/mrd.23572>
 99. Ollinger, K., Roberg, K., 1997. Nutrient deprivation of cultured rat hepatocytes increases the desferrioxamine-available iron pool and augments the sensitivity to hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 272, 23707–23711. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23707>
 100. Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V., Torti, F.M., 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 357, 241–247. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570241>
 101. Pak, M., Lopez, M.A., Gabayan, V., Ganz, T., Rivera, S., 2006. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 108, 3730–3735. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-028787>
 102. Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276, 7806–7810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>
 103. Pasricha, S.-R., McHugh, K., Drakesmith, H., 2016. Regulation of Hepcidin by Erythropoiesis: The Story So Far. *Annual Review of Nutrition* 36, 417–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050731>
 104. Patel, B.N., Dunn, R.J., David, S., 2000. Alternative RNA Splicing Generates a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Form of Ceruloplasmin in Mammalian Brain. *Journal of Biological Chemistry* 275, 4305–4310. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4305>
 105. Petry, N., Egli, I., Zeder, C., Walczyk, T., Hurrell, R., 2010. Polyphenols and phytic acid contribute to the low iron bioavailability from common beans in young women. *J Nutr* 140, 1977–1982. <https://doi.org/10.3945/jn.110.125369>
 106. Planque, N., 2006. Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Commun Signal* 4, 7. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-4-7>
 107. POLSUS, 2024. Wyniki oceny trzody chlewnej w 2023 roku. Polski Związek Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej, Warszawa.
 108. Ponka, P., Tenenbein, M., Eaton, J.W., 2015. Chapter 41 - Iron, in: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (Fourth

- Edition). Academic Press, San Diego, pp. 879–902. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00041-X>
109. Posey, J.E., Gherardini, F.C., 2000. Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science* 288, 1651–1653. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1651>
 110. Prohaska, J.R., 2011. Impact of copper limitation on expression and function of multicopper oxidases (ferroxidases). *Adv Nutr* 2, 89–95. <https://doi.org/10.3945/an.110.000208>
 111. Radlowski, E.C., Johnson, R.W., 2013. Perinatal iron deficiency and neurocognitive development. *Front Hum Neurosci* 7, 585. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00585>
 112. Renassia, C., Peyssonnaud, C., 2019. New insights into the links between hypoxia and iron homeostasis. *Curr Opin Hematol* 26, 125–130. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000494>
 113. Repka, T., Hebbel, R.P., 1991. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood* 78, 2753–2758.
 114. Ryu, M.-S., Duck, K.A., Philpott, C.C., 2018. Ferritin Iron Regulators, PCBP1 and NCOA4, Respond to Cellular Iron Status in Developing Red Cells. *Blood Cells Mol Dis* 69, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.09.009>
 115. Sanchez, M., Galy, B., Muckenthaler, M.U., Hentze, M.W., 2007. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 α expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 14, 420–426. <https://doi.org/10.1038/nsmb1222>
 116. Sangkhae, V., Nemeth, E., 2019. Placental iron transport: The mechanism and regulatory circuits. *Free Radical Biology and Medicine* 133, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.001>
 117. Shah, Y.M., Matsubara, T., Ito, S., Yim, S.-H., Gonzalez, F.J., 2009. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab* 9, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.012>
 118. Sharp, P., Srai, S.K., 2007. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol* 13, 4716–4724. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i35.4716>
 119. Shvartsman, M., Ioav Cabantchik, Z., 2012. Intracellular iron trafficking: role of cytosolic ligands. *Biometals* 25, 711–723. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9529-7>
 120. Steinbicker, A.U., Muckenthaler, M.U., 2013. Out of balance--systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients* 5, 3034–3061. <https://doi.org/10.3390/nu5083034>
 121. Sukhbaatar, N., Weichhart, T., 2018. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals (Basel)* 11, 137. <https://doi.org/10.3390/ph11040137>
 122. Svoboda, M., Drabek, J., 2005. Iron deficiency in suckling piglets: Etiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Vet* 49, 104–111.
 123. Szöke, D., Panteghini, M., 2012. Diagnostic value of transferrin. *Clin Chim Acta* 413, 1184–1189. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.04.021>
 124. Szudzik, M., Starzyński, R.R., 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, 128. <https://doi.org/10.3390/ph11040128>

125. Takeuchi, K., Bjarnason, I., Laftah, A.H., Latunde-Dada, G.O., Simpson, R.J., McKie, A.T., 2005. Expression of iron absorption genes in mouse large intestine. *Scand J Gastroenterol* 40, 169–177. <https://doi.org/10.1080/00365520510011489>
126. Thorsen, C.K., Schild, S.-L.A., Rangstrup-Christensen, L., Bilde, T., Pedersen, L.J., 2017. The effect of farrowing duration on maternal behavior of hyperprolific sows in organic outdoor production. *Livestock Science* 204, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.08.015>
127. Trist, B.G., Hilton, J.B., Hare, D.J., Crouch, P.J., Double, K.L., 2021. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew Chem Int Ed Engl* 60, 9215–9246. <https://doi.org/10.1002/anie.202000451>
128. Van Dyke, B.R., Saltman, P., 1996. Hemoglobin: a mechanism for the generation of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 20, 985–989. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02186-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02186-8)
129. van Santen, S., Kroot, J.J.C., Zijderveld, G., Wiegerinck, E.T., Spaanderman, M.E.A., Swinkels, D.W., 2013. The iron regulatory hormone hepcidin is decreased in pregnancy: a prospective longitudinal study. *Clin Chem Lab Med* 51, 1395–1401. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0576>
130. Venn, J. a. J., Mccance, R.A., Widdowson, E.M., 1947. Iron metabolism in piglet anaemia. *J Comp Pathol Ther* 57, 314–325. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(47\)80037-2](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(47)80037-2)
131. Vokurka, M., Krijt, J., Šulc, K., Nečas, E., 2006. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 667–674. <https://doi.org/10.33549/physiolres.930841>
132. Voltarelli, V.A., Alves de Souza, R.W., Miyauchi, K., Hauser, C.J., Otterbein, L.E., 2023. Heme: The Lord of the Iron Ring. *Antioxidants (Basel)* 12, 1074. <https://doi.org/10.3390/antiox12051074>
133. 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. <https://doi.org/10.1038/5979>
134. Wang, X., Garrick, M.D., Collins, J.F., 2019. Animal Models of Normal and Disturbed Iron and Copper Metabolism. *J Nutr* 149, 2085–2100. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz172>
135. Ward, D., Kaplan, J., 2012. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1426–1433. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.03.004>
136. Warner, M.J., Kamran, M.T., 2024. Iron Deficiency Anemia, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
137. Weinberg, E.D., 1997. The Lactobacillus Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine* 40, 578–583.
138. Weinborn, V., Valenzuela, C., Olivares, M., Arredondo, M., Weill, R., Pizarro, F., 2017. Prebiotics increase heme iron bioavailability and do not affect non-heme iron bioavailability in humans. *Food Funct* 8, 1994–1999. <https://doi.org/10.1039/c6fo01833e>

139. West, A.-R., Oates, P.-S., 2008. Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol* 14, 4101–4110. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4101>
140. Willemetz, A., Lenoir, A., Deschemin, J.-C., Lopez-Otin, C., Ramsay, A.J., Vaulont, S., Nicolas, G., 2014. Matriptase-2 is essential for hepcidin repression during fetal life and postnatal development in mice to maintain iron homeostasis. *Blood* 124, 441–444. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-551150>
141. Yanatori, I., Tabuchi, M., Kawai, Y., Yasui, Y., Akagi, R., Kishi, F., 2010. Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol* 11, 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-39>
142. Yang, F.M., Friedrichs, W.E., Cupples, R.L., Bonifacio, M.J., Sanford, J.A., Horton, W.A., Bowman, B.H., 1990. Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* 265, 10780–10785. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)87015-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)87015-6)

8. Załączniki

8.1. Informacje o charakterze udziału i wkładzie autorów w publikacjach

Kopeć Z, Starzyński RR, Jończy A, Mazgaj R, Lipiński P. Role of Iron Metabolism-Related Genes in Prenatal Development: Insights from Mouse Transgenic Models. Genes (Basel). 2021 Sep 2;12(9):1382.

Lp.	Imię i nazwisko	Opis udziału autora	% udział w publikacji	Jednostka
1.	Zuzanna Kopeć	Konceptualizacja, przygotowanie manuskryptu	60	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
2.	Rafał R. Starzyński	pisanie – recenzja i redakcja	10	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
3.	Aneta Jończy	pisanie – recenzja i redakcja	5	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
4.	Rafał Mazgaj	pisanie – recenzja i redakcja	5	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
5.	Paweł Lipiński	Konceptualizacja, przygotowanie manuskryptu, finansowanie badań,	20	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN

Kopec Z, Mazgaj R, Starzyński RR, Wang X, Opiela J, Smorąg Z, Gajda B, Nicpoń J, Lenartowicz M, Ogłuszka M, Gralak MA, Lipiński P. Impact of litter size on the hematological and iron status of gilts, sows and newborn piglets: a comparative study of domestic pigs and wild boars. BMC Vet Res. 2024 Feb 23;20(1):64.

Lp.	Imię i nazwisko	Opis udziału autora	% udział w publikacji	Jednostka
1.	Zuzanna Kopec	Konceptualizacja, metodologia – pobranie materiału, przeprowadzenie doświadczeń analiza wyników, przygotowanie manuskryptu	60	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
2.	Rafał Mazgaj	Metodologia – pobranie materiału	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
3.	Rafał R. Starzyński	Metodologia – pobranie materiału, pisanie – recenzja i redakcja	7	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
4.	Xiuying Wang	Metodologia – pobranie materiału	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
5.	Jolanta Opiela	Metodologia – transfer zarodków	2	Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy
6.	Zdzisław Smorąg	Metodologia – transfer zarodków	2	Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy
7.	Barbara Gajda	Metodologia – transfer zarodków	2	Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy
8.	Jakub Nicpoń	Metodologia – pobranie materiału	2	Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

9.	Małgorzata Lenartowicz	Metodologia	2	Uniwersytet Jagielloński
10.	Magdalena Ogłuszka	Metodologia – pobranie materiału	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
11.	Mikołaj A. Gralak	Analiza statystyczna	2	Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
12.	Paweł Lipiński	Konceptualizacja, przygotowanie manuskryptu, finansowanie badań,	15	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN

Kopec Z, Starzyński RR, Lenartowicz M, Grzesiak M, Opiela J, Smorąg Z, Gajda B, Nicpoń J, Ogłuszka M, Wang X, Mazgaj R, Stankiewicz A, Płonka W, Pirga-Niemiec N, Herman S, Lipiński P. Comparison of Molecular Potential for Iron Transfer across the Placenta in Domestic Pigs with Varied Litter Sizes and Wild Boars. *Int J Mol Sci.* 2024 Sep 5;25(17):9638.

Lp.	Imię i nazwisko	Opis udziału autora	% udział w publikacji	Jednostka
1.	Zuzanna Kopec	Konceptualizacja, metodologia – pobranie materiału, przeprowadzenie doświadczeń analiza wyników, wizualizacja przygotowanie manuskryptu	60	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
2.	Rafał R. Starzyński	Metodologia – pobranie materiału, analiza laboratoryjna, pisanie – recenzja i redakcja	4	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
3.	Małgorzata Lenartowicz	Metodologia	2	Uniwersytet Jagielloński
4.	Małgorzata Grzesiak	Metodologia	2	Uniwersytet Jagielloński
5.	Jolanta Opiela	Metodologia – transfer zarodków	2	Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy
6.	Zdzisław Smorąg	Metodologia – transfer zarodków	2	Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy
7.	Barbara Gajda	Metodologia – transfer zarodków	2	Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy

8.	Jakub Nicpoń	Metodologia – pobranie materiału	2	Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
9.	Magdalena Ogłuszka	Metodologia – pobranie materiału	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
10.	Xiuying Wang	Metodologia – pobranie materiału	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
11.	Rafał Mazgaj	Metodologia – pobranie materiału	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
12.	Adrian Stankiewicz	Analiza wyników, wizualizacja	2	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
13.	Wiktoria Płonka	Metodologia	2	Uniwersytet Jagielloński
14.	Natalia Pirga-Niemiec	Metodologia	2	Uniwersytet Jagielloński
15.	Sylvia Hermann	Metodologia	2	Uniwersytet Jagielloński
16.	Paweł Lipiński	Konceptualizacja, przygotowanie manuskryptu, finansowanie badań,	10	Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN

8.2. Publikacje

Review

Role of Iron Metabolism-Related Genes in Prenatal Development: Insights from Mouse Transgenic Models

Zuzanna Kopeć , Rafał R. Starzyński, Aneta Jończy , Rafał Mazgaj  and Paweł Lipiński *

Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzębiec, Poland; z.kopec@igbzpan.pl (Z.K.); r.starzynski@igbzpan.pl (R.R.S.); a.jonczy@igbzpan.pl (A.J.); r.mazgaj@igbzpan.pl (R.M.)

* Correspondence: p.lipinski@igbzpan.pl

Abstract: Iron is an essential nutrient during all stages of mammalian development. Studies carried out over the last 20 years have provided important insights into cellular and systemic iron metabolism in adult organisms and led to the deciphering of many molecular details of its regulation. However, our knowledge of iron handling in prenatal development has remained remarkably under-appreciated, even though it is critical for the health of both the embryo/fetus and its mother, and has a far-reaching impact in postnatal life. Prenatal development requires a continuous, albeit quantitatively matched with the stage of development, supply of iron to support rapid cell division during embryogenesis in order to meet iron needs for erythropoiesis and to build up hepatic iron stores, (which are the major source of this microelement for the neonate). Here, we provide a concise overview of current knowledge of the role of iron metabolism-related genes in the maintenance of iron homeostasis in pre- and post-implantation development based on studies on transgenic (mainly knock-out) mouse models. Most studies on mice with globally deleted genes do not conclude whether underlying in utero iron disorders or lethality is due to defective placental iron transport or iron misregulation in the embryo/fetus proper (or due to both). Therefore, there is a need of animal models with tissue specific targeted deletion of genes to advance the understanding of prenatal iron metabolism.

Keywords: blastocyst; development; embryo; fetus; gene deletion; implantation; iron; mouse; prenatal



Citation: Kopeć, Z.; Starzyński, R.R.; Jończy, A.; Mazgaj, R.; Lipiński, P. Role of Iron Metabolism-Related Genes in Prenatal Development: Insights from Mouse Transgenic Models. *Genes* **2021**, *12*, 1382. <https://doi.org/10.3390/genes12091382>

Academic Editor: Sergi Puig

Received: 2 August 2021

Accepted: 1 September 2021

Published: 2 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Iron is an essential redox element that functions as a cofactor of many hemo- and iron-sulfur [Fe-S] proteins required to sustain fundamental life processes including DNA synthesis and repair, ATP production, cell cycle, oxygen transport, and detoxification. There is a widespread consensus that an accurate iron delivery to the sites of intracellular iron-sulphur ([Fe-S]) clusters biogenesis and heme molecules synthesis within the cells is a key distinguishing feature of intracellular iron homeostasis [1,2]. However, considering that the redox activity of iron can generate, through the Fenton reaction, hydroxyl free radicals capable of causing a wide range of biological damage [3], the second challenge of iron homeostasis is minimizing its toxicity. This dual homeostatic assignment is achieved via the functioning of a complex protein machinery involving transmembrane iron transporters, chaperones, iron storage proteins, ferrireductases, and ferroxidases. Cellular iron uptake, storage, efflux, and utilization are to a large extent coordinated and post-transcriptionally regulated via iron regulatory proteins (IRP1 and IRP2), the cytosolic iron sensors that bind iron-responsive elements (IRE) in regulated messenger RNAs [1]. The management of iron at the systemic level must adjust exogenous (dietary iron absorption by duodenal enterocytes) and endogenous (iron recycled from senescent red blood cells by macrophages) iron supply to satisfy the iron needs of the organism related mostly to the haemoglobinization of new red blood cells during the process of erythropoiesis. As there is no homeostatic

mechanism for the excretion of excess iron from the organism, it is therefore clear that the control of total body iron content occurs at the level of dietary absorption. This meticulous regulation largely relies on the hepcidin and ferroportin interaction [4] but also involves hypoxia inducible factor-2, which regulates the expression of key genes that contribute to iron absorption [5]. The liver-derived hormone hepcidin, considered the central regulatory molecule of systemic iron homeostasis [6], controls systemic iron levels by blocking the iron-exporting protein ferroportin in duodenal enterocytes, hepatocytes and reticuloendothelial macrophages, the sites of iron absorption, storage and recycling, respectively [7,8]. By inhibiting major flows of iron into the circulation, hepcidin maintains an adequate level of iron bound to transferrin, (blood plasma protein, a major vehicle for iron delivery to cells) which is a hallmark of systemic iron balance.

This clipped outline of mammalian iron homeostasis is derived mainly from studies of patients with inherited iron homeostasis disorders and mutant animal models carried out over the last 20 years, depicting iron handling in adult organisms. Much less is known about how iron metabolism is balanced at various stages of prenatal development. Considering that the mammalian embryo undergoes a variety of changes as development proceeds from the one-cell to the pre- and post-implantation stages, and then to the fetus, the key focus of prenatal iron metabolism is quantitatively differentiated iron acquisition, which means that it depends on the developmental stage. The mammalian embryo/fetus grows extremely fast, and the embryos must produce more and more red blood cells to accommodate this growth. The rate of erythropoiesis in utero, depending on the stage of development, is a central determinant of iron needs. One of the main iron-metabolism pathways in prenatal life that has yet to be fully explored is unidirectional iron delivery to the embryo/fetus. It is believed that iron is not transferred in the reverse direction [9]. In contrast to well-defined pathways of intestinal absorption of exogenous iron operating postnatally, in prenatal life, iron reaches to the organism through the transfer across at first the visceral endoderm (VE), then structures called “early placenta” [8] and fully developed/specialized placenta. This process is the subject of a complex, regulatory interplay among the mother, fetus, and the placenta itself (reviewed in [10]).

The targeted disruption of iron metabolism genes in mice resulting in the retardation of embryonic development or causing embryonic lethality has proved to be a valuable tool for deciphering prenatal iron regulatory processes. This review compiles current data from transgenic and spontaneous mutant mouse models (Table 1), which have proven successful at providing insights into the molecular mechanisms of the maintenance of iron homeostasis in the embryo proper and placental iron transport. Considering that mouse models replicate the main features of human iron metabolism [11], and taking into account some similarities between murine and human placental development and structure [12], our review may provide insight into prenatal iron handling in humans.

Table 1. Impact of the deletion of iron metabolism genes in mice on prenatal development.

Gene	Gene Product	Function	Phenotype	Reference
<i>Fth1</i>	Ferritin (Ft) H-subunit	Ferroxidase activity, essential for iron uptake by the ferritin molecule	Lethality from E3.5 to E9.5	[13]
<i>Ftl1</i>	Ferritin (Ft) L-subunit	Has a nucleation site involved in iron-core formation inside the protein envelope	Partial (about 50%) lethality at E11.5–E13.5	[14]
<i>Tfr1</i>	Transferrin receptor 1	Import of iron from transferrin into cells by endocytosis	Lethality after implantation, by E12.5 Affected both erythropoiesis and neurologic development	[15]
<i>Slc11a2</i>	Divalent metal ion transporter 1 (DMT1)	Transport of ferrous iron (Fe^{2+}) and some divalent metal ions across the plasma membrane and/or out of the endosomal compartment.	No data about prenatal development. Newborn mice are anemic, without developmental abnormalities.	[16]

Table 1. Cont.

Gene	Gene Product	Function	Phenotype	Reference
<i>Slc40a1</i>	Ferroportin (Fpn)	Transport of iron from the inside of a cell to the extracellular environment.	Lethality around E7.5 in embryos with global KO. Rescue of embryonic lethality through selective KO of ferroportin in the embryo proper	[17]
<i>Aco 1 (Irp1) Irp2</i>	Iron Regulatory Proteins 1 and 2	Role in post-transcriptional regulation of several mRNAs encoding iron metabolism proteins	No overt abnormalities in either Irp1 nor Irp2 knockout embryos/fetuses. Lethality of double Irp1 and Irp2 KO embryos at E6.5 and beyond. Functional iron deficiency	[18]
<i>Hamp1</i>	Hepcidin	Central regulator of systemic iron homeostasis. Role in the regulation of the entry of iron into the circulation	Global hepcidin knock-out has no effect on placental or fetal liver iron status in iron-replete or iron-deficient pregnancies. Reduction of hepatic iron content, decrease in hemoglobin concentration in liver-specific hepcidin KO embryos. Severe microcytic anemia in fetuses with transgenic ubiquitous overexpression of the <i>Hamp</i> gene	[19–21] ¹
<i>Tmprss6</i>	Matriptase-2	Suppressor of hepatic hepcidin expression	Strongly up-regulated liver hepcidin and decreased placental ferroportin expression. Reduction in total non-heme body iron, and some red blood cell indices in E17.5 fetuses, hallmarking iron deficiency and microcytic anemia	[22]
<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase 1 (HO1)	Role in in the enzymatic breakdown of heme molecules	Abnormal placentation, inadequate remodeling of spiral arteries, intrauterine growth restriction, and eventually fetal lethality	[23]
<i>Flvcr1</i>	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	Export of cytoplasmic heme to the outside of the cell	Deficient red cell production. Lethality at one of two embryonic times: at or before E7.5 and between E14.5 and E16.5.	[24]
<i>ISCA1</i>	Iron-sulfur cluster assembly 1	Iron-sulfur cluster (Fe-S) carrier, accepting (Fe-S) from a scaffold protein and transferring it to target proteins	Lethality at E8.5 and beyond. Damage to the electron transport chain and TCA cycle.	[25] ²
<i>Fxn, Frda</i>	Fraixin	Precise function remains unclear. Involvement in Fe-S cluster and heme synthesis, energy conversion and oxidative phosphorylation, iron handling and response to oxidative damage	At E7.5 and E8.5 embryos start to be resorbed and reduced to a small mass of embryonic tissue surrounded by maternal hemorrhagic tissue. Complete resorption at E9.5.	[26]

¹ Overexpression of the gene; ² knockout of the gene performed in rats.

2. Iron Handling in a Mouse Embryo during Preimplantation Development

The timeline of embryonic development is defined by the flow of time from the fertilization. Thus, in mice, the age of the embryo is usually expressed in half-day intervals since the time of mating, which is determined by the detection of a vaginal plug. Assuming that fertilization usually takes place around midnight and that checking for the plug is performed early in the morning, 0.5 post-coitum (post-coital age) or embryonic (E) day 0.5 (embryonic age) is considered to correspond with noon on the day on which the vaginal plug is found. In mice, preimplantation development of the embryo includes several stages from the fertilization of the oocyte (*ovum*) in the oviduct to the formation of the zygote, which then undergoes successively cleavage divisions to generate a blastocyst initially consisting of the trophectoderm and the inner cell mass, which subsequently differentiates into the epiblast and the primitive endoderm of yolk sac tissue and the embryo proper and

the most of fetal membranes [27]. In the mice, expanded blastocyst of around one hundred cells implants in the uterus at E4.5 [28–30].

Although iron is required in high amounts for numerous critical bioreactions and biosynthetic pathways in rapidly dividing cells, including heme synthesis, respiratory chain function, and DNA synthesis, it seems that the iron demand of the embryo during the preimplantation period is well-balanced using endogenous sources. This may be due to high iron stores contained in the oocyte, which are sufficient to sustain early embryonic development. In the oocyte of *xenopus laevis*, iron does not vary throughout the first 50 stages of development, when all tadpole organs are forming. Hence, the complement of iron needed for incorporation into apoproteins during development is already present at a time when oocyte maturation is completed. It can therefore be considered that there is a sufficiently supply of iron in the oocyte [31]. In porcine embryo studies, iron deficiency leads to severe apoptosis in blastocysts, which may be explained by mitochondrial dysfunction [32]. Indeed, oocyte development takes place in an iron-rich environment provided by ovarian follicles [33]. Transferrin (Tf) has been identified as an important protein constituent of follicular fluid [33]. Furthermore, the expression of Tf and transferrin receptor 1 (TfR1) genes has been detected in the human granulosa cells that surround the oocyte within the follicle and function to produce sex steroids, as well as numerous growth factors thought to influence oocyte development [34]. The most abundant intracellular source of iron is ferritin (Ft), a ubiquitous cytoplasmic protein composed of a protein shell that can accommodate up to 4500 atoms of iron. It has the dual functions of iron detoxification and iron reserve. Ferritin is a heteropolymer composed of 24 subunits of two types: L (FTL1 for light) and H (FTH1 for heavy), depending on their relative molecular weights. The two subunit types have different functional properties. The H chain has an iron-binding site and exhibits ferroxidase activity, whereas the L chain, has a nucleation site involved in iron-core formation [35]. Iron released from Ft may involve ferritinophagy, a ferritin autophagic degradation process mediated by the selective nuclear receptor coactivator-4 (NCOA4). NCOA4 binds to ferritin and delivers it to nascent autophagosomes, which then merge together with the lysosomes causing Ft degradation and the release of iron that can be reused in cellular processes [36]. The result of the targeted deletion of the gene encoding H-Ft highlights its unique ferroxidase activity, which is indispensable in early embryonic development. The timeline analysis of the lethality of embryos homozygous for the non-functional *Fth1* allele (*Fth1*^{−/−}) clearly indicated that they die between days E3.5 and E9.5 days of development. Genotyping of the E3.5 embryos (obtained from *Fth1*^{+/-} females crossed with *Fth1*^{−/−} males) revealed that *Fth1*^{−/−} blastocysts were present at the expected Mendelian frequency (~25%) and displayed a normal morphology [13]. These results strongly suggested that the autonomous growth of *Fth1*^{−/−} embryos from fertilization to day E3.5 may rely on the use of maternal ferritin-derived iron present in the oocyte. On the other hand, this study show that the absence of a functional intracellular cytoplasmic ferritin is lethal to embryonic cells just after E3.5. The possible reason for this is that iron increasingly entering into the embryo cells after blastocyst implantation cannot be sequestered and detoxified, initiating the Fenton reaction and overproduction of highly toxic hydroxyl radicals. In contrast to the total early embryonic lethality of the *Fth1* gene deletion in mice, truncation of the *Ftl* gene is only partially (in about 50%) lethal and occurs at later stages of embryonic development, i.e., at E11.5–E13.5. Interestingly, surviving *Ftl*^{−/−} embryos were phenotypically normal and survived until birth [14]. Although iron status in survived *Ftl*^{−/−} embryos has not been examined, the results of this study indicate that expression of the H subunit can rescue the loss of the L subunit and that FTH1 homopolymers still have some capacity to sequester iron as previously demonstrated in vitro studies [37].

Although the membrane transferrin receptor 1 (TfR1)-mediated endocytosis of the complex of transferrin bound iron is the major route of cellular iron uptake for most mammalian cells (in particular to erythroid cells) [38], it seems that the iron-delivery pathway is not of major importance for the progression of the development from the zygote

to the blastocyst stage. Embryos with global deletion of the *TfR1* gene die much later after implantation, i.e., by E12.5 [15]. However, the data do not allow us to determine whether embryos death is due to insufficient placental iron transport via embryonic TfR1 and maternal transferrin, impaired erythroid iron uptake by embryonic proteins, or both. The synthesis of embryonic transferrin starts by the E7.5 day of gestation mainly in the yolk sac and liver [39]. Interestingly, *hpx* mice with splicing defects in the *Tf* genes that fail to express appropriate transferrin levels (producing less than 1% of the normal level of serum transferrin) are viable at birth, though they are profoundly anemic (they develop severe microcytic hypochromic anaemia) and can only survive for up to two weeks after birth [40]. It is not excluded that in mice lacking transferrin, non-transferrin bound iron (which usually appears in the blood plasma when transferrin becomes fully saturated with iron [41], could be a likely iron source for the fetus in these conditions. These findings provide strong evidence that the transferrin-iron utilization through the TfR1-transferrin pathway is indispensable for iron delivery to embryonic/fetal erythroid cells, and that transferrin is the major physiological iron source for prenatal erythropoiesis.

Lactoferrin (Lf), a glycoprotein of the transferrin family found in mucosal secretions, possesses a wide range of functions including iron-binding and transferring functions [42]. In mice, uterine expression of lactoferrin (LF) during the preimplantation period has been demonstrated from days one to eight of pregnancy [43]. Mammalian Lf receptors (LfR) play pivotal roles in mediating multiple Lf functions [44]. Although the Lf-LfR pathway has been suggested to deliver iron to the pre-implantation embryo [18], the presence of LfR at this stage of prenatal development has not been examined yet. LfR may be important for the function of Lf in the late post-implantation stages [45].

The iron regulatory proteins (IRP1 and IRP2) are two cytoplasmic RNA-binding proteins involved in the mechanisms that control iron metabolism in mammalian cells. They modulate the expression of iron-related proteins at a post-transcriptional level by binding to specific iron regulatory elements (IREs) on their mRNAs. IRP-IRE interaction can block protein synthesis or stabilize the mRNA. At low intracellular iron concentration, IRPs bind to the IRE of the ferritin subunits or ferroportin mRNAs and block their translation. Direct interactions between IRPs and IRE motifs stabilize TfR1 and DMT1 (divalent metal transporter 1) mRNAs. The converse regulation of Ft subunits and TfR1 synthesis, being a consequence of the lack of binding of IRPs to IRE, occurs in cells with high iron levels. Thus, IRP-mediated regulation rapidly restores the physiological levels of iron both when it is deficient and in excess. Animal models of IRP deficiency have proven useful for defining the specific as well as redundant functions of IRP1 and IRP2 under basal conditions [46,47] or in response to iron fluctuations [48]. Neither deletion of the *Irp1* nor the *Irp2* gene is embryonically lethal although mice with targeted deletion of IRP2 display microcytic anemia and iron mismanagement in most tissues. This shows us that IRP2 is critical for maintaining the iron balance in vivo [46,47]. In contrast, IRP1-null mice exhibit no spontaneous iron misregulation [47,48]. However, mice that completely lack both IRPs cannot survive through the gestation. The embryonic lethality of double knock-out manifests at the blastocyst stage before implantation [18]. A possible reason for the early death of *Irp1*^{-/-}/*Irp2*^{-/-} is functional iron deficiency. This means that in the absence of IRPs (repressors of H- and L-Ft translation) ferritin is abnormally up-regulated: thus, iron sequestered in the Ft shell may not be available for the metabolic needs of the blastocyst.

3. Iron Metabolism Proteins in Mouse Post-Implantation Development

The increasing nutrients (including iron) needs of the mammalian embryo during post-implantation development are met by the decidua and later placenta, a specialized organ that enables the exchange of nutrients, gases and wastes exchange between the maternal and embryonic/fetal compartments. The optimal transfer of iron across the placenta is essential for fetal development in utero and for the establishment of adequate birth iron stores to sustain growth in early infancy. However, in mice, the mature placenta appears at

E14.5 [30]. Prior to placenta formation, the extraembryonic visceral endoderm functions in maternoembryonic nutrient (including iron) transport prior to placenta formation [49].

During mice implantation (E4.5), the mural trophoblast surrounding the blastocyst cavity differentiates into nondividing primary trophoblast giant cells. The polar trophoblast, adjacent to the inner cell mass, proliferates to form the ectoplacental cone and develops multitude of secondary giant cells. Post-implantation, the spherically shaped blastocyst transforms into the cylindrical. During this process, the polar TE generates the ExE (the extraembryonic ectoderm) [50]. After implantation, the primitive endoderm differentiates into the parietal and visceral endoderm. The former lies adjacent to giant trophoblast cells and gives rise to the endoderm of the parietal yolk sac. The second lineage, the visceral endoderm, which lies adjacent to the extraembryonic mesoderm gives rise to the visceral yolk sac, and takes part in primitive hematopoiesis and vasculogenesis [51,52]. In mice, the mature E14.5 placenta is composed of the maternal decidua on the outside, the junctional zone, and the innermost labyrinth [53]. In the decidua, the endothelium is replaced by trophoblast cells, and promotes the transition to hemochorial placenta [54]. The junctional zone at the implantation site consists of spongiotrophoblast cells and giant trophoblast cells. Nutrient exchange occurs in the labyrinth. It is composed of the trophoblasts of two layers of multi-nucleated syncytiotrophoblast [55].

The iron resources of the embryo are largely insufficient for sustaining its development during the post-implantation period. Therefore, the mechanisms of the continuous supply of extraembryonic iron from the maternal environment must be triggered at around day E4.5 to balance growing embryo iron requirements. Our current understanding of the molecular mechanisms by which iron is transferred across the mature, vascularized placenta has been the focus of recent reviews [10,56]. Briefly, iron metabolism genes that have roles in the maintenance of iron homeostasis in the adult often function in embryo proper and placental development as well. In the term placenta the unidirectional iron flux mediated by polarized syncytiotrophoblasts involves apical and basal transporters such as TfR1, DMT1, ZIP8, ZIP14 and ferroportin, respectively [10,56,57]. Much less is known about iron transport to the embryo/fetus at the earlier stages of placental development, from the initiation and maintenance of the trophoblast lineage to the complex functions of the mature placenta. The main insights into the molecular mechanisms of iron metabolism in the fetus have come from the study of various mouse models with disrupted iron metabolism genes. If a gene is indispensable for the embryo proper and placental iron transport, the targeted mutant embryo might die before later phenotypes become apparent. However, the global deletion of a gene resulting in the embryonic lethality does not allow us to conclude whether it is indispensable for placental iron transport or for the handling of iron in the embryo proper, or both. Therefore, selective inhibition of a gene in the embryo proper (as in the case of the *Slc40a1* gene coding for ferroportin [17]) or in the placenta is needed to precisely determine its role in the prenatal development. The delivery of iron to most cells occurs following the binding of transferrin-to-transferrin receptor 1 (TfR1) on the cell membrane. The transferrin-TfR1 complexes are then internalized by endocytosis, and iron is released from transferrin via a process involving endosomal acidification [58]. Released iron, before being exported out of endosome, is reduced from Fe^{3+} to Fe^{2+} by Steap3, a member of a unique family of Steap (six transmembrane epithelial antigen of the prostate), the transmembrane reductases [59]. The expression of TfR1 becomes evident in early post-implantation mouse embryos. At E6.5 its presence has been detected in the ectoplacental cone and mural trophoblast giant cell populations, as well as in the embryonic ectoderm. With development, TfR1 is progressively lost from trophoblast giant cells and at around E8.5, it is undetectable as these cells reach their terminal differentiation state. In contrast, the rapidly proliferating cells of the extra-embryonic ectoderm continue to express high levels of TfR1. In the E10.5 placenta, TfR1 is expressed primarily on the differentiated labyrinthine trophoblast cells involved in the maternal-fetal transfer of iron. Among mammalian cells the highest TfR1 level has been found in nucleated erythroid precursors and placental syncytiotrophoblasts [58]. Furthermore, TfR1 is highly up-regulated in the

placenta under conditions of maternal iron scarcity [19,60]. All these data suggest that TfR1-mediated iron-transferrin uptake from the maternal source plays an important role in early embryonic post-implantation development and beyond. Embryos homozygous for a null allele of TfR1 (*TfR1*^{−/−}) die by E12.5. However, some of them are not anemic and show normal number of circulating hemoglobinized erythroid cells in their vasculature as late as E10.5, implying that the transferrin-TfR1 pathway may not be essential for erythropoiesis during early development.

Divalent metal transporter (DMT1), encoded by the *Slc11a2* gene, is a divalent metal-ion transporter conserved from prokaryotes to higher eukaryotes that exhibits an unusually broad substrate range of divalent metals, including Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, and Pb²⁺, and mediates pH-dependent active proton-coupled transport [61]. DMT1 is the apical membrane iron transporter found in the epithelial cells of the duodenum, renal proximal and/or distal tubules. It is also the endosomal iron transporter in the transferrin cycle of developing red blood cells in the bone marrow and other cells [61]. It is also expressed in the placenta, where it potentially participates in materno-fetal iron transfer [57,62]. Microcytic anemia (*mk*) mice [63] and the Belgrade (*b*) rat [64], showing inherited defects in intestinal iron absorption and erythroid iron utilization that result in iron deficiency anemia, have the same spontaneous missense mutation (G185R) in *Slc11a2*. Similarly, mice with global deletion of the *Slc11a2* gene are born anemic, although iron deficiency anemia in DMT1 knock-out mice is more severe than that observed in animals homozygous for the G185R mutation [16]. Interestingly, at birth, total body iron content is normal, and hepatic iron stores are even increased in *Slc11a2*^{−/−} mice compared to wild-type animals. This indicates that DMT1 is dispensable for efficient iron materno-fetal iron transfer. On the other hand, it is necessary for normal iron uptake by erythroid precursor cells, and thus, for the correct course of fetal erythropoiesis. Other potential apical transporters involved in iron trafficking are the ZRT/IRT-like protein (ZIP)14 (ZIP14; encoded by the *Slc39a14* gene) and ZIP8 (encoded by the *Slc39a8* gene). Both ZIP14 and ZIP8 are able to transport iron and expressed in mouse placenta [65]. ZIP14 also has been shown to mediate plasma membrane uptake of non-transferrin-bound iron as well [66]. *Slc39a14*^{−/−} do not differ phenotypically from controls except for lower birth weight [67]. During mouse pregnancy, the level of placental Zip8 mRNA expression increases with development [67]. Deletion of the *Slc39a8*^{−/−} gene in mice leads to preweaning mortality [65]. This suggests more important role of ZIP8 in the iron homeostasis than ZIP14 and DMT1. In vertebrates, ferroportin (Fpn), the only known cellular iron exporter encoded by the *Slc40a1* gene, plays a pivotal role in cellular iron release, a function underlying systemic iron-metabolism processes, such as iron absorption by duodenal enterocytes, the recycling of iron derived from senescent erythrocytes by reticuloendothelial macrophages, and iron release from stores in hepatocytes [7]. Fpn has also been assigned the role of iron transporter in the placenta [17]. Indeed, Fpn is abundantly expressed along the basal membrane of human term placenta syncytiotrophoblasts [68] and mouse labyrinthine trophoblasts [69]. Furthermore, the strong up-regulation of placental Fpn expression during course of gestation (from day E12.5 to day E18.5) clearly indicates its importance in meeting the accelerating iron requirements of the developing embryo/fetus [70,71]. Importantly, studies in mice with a targeted disruption of the *Slc40a1* gene indicated a crucial and non-redundant role in iron supply to the developing embryo at the very early stage after implantation. The complete targeted disruption of the *Slc40a1* gene in mice, was lethal before E7.5, likely due to iron deficiency [17]. Immunohistochemical staining for ferroportin in a wild-type E7.0 embryo clearly indicated the basolateral expression of Fpn in the polarized epithelial cells of the extraembryonic visceral endoderm (exVE), while similar staining in a *Slc40a1*^{−/−} showed no evidence of Fpn presence. Interestingly, disruption of the *Slc40a1* gene in all tissues except exVE rescued embryonic lethality, thus confirming the essential role of ferroportin in iron export to the embryo through this “early placenta” structure. Studies in transgenic animals with aberrant Fpn1 expression provide further evidence for the role of Fpn in maternal-fetal iron transport. Mouse embryos with a hypomorphic mutation in Fpn1 are

severely iron deficient at E12.5 and exhibit defects in neural tube closure and forebrain patterning [69].

As already mentioned above, hepcidin, an iron-regulatory hormone produced mainly by the liver, controls plasma iron concentrations, tissue iron content and distribution by inhibiting major flows of this microelement into the circulation [4]. Transfer of iron across the placenta to the fetus may be regulated by maternal, placental and fetal hepcidin. The downregulation of maternal hepatic hepcidin expression and the lowering of its plasma level during pregnancy [10,70], increase iron bioavailability, and thus enhancing iron transport mediated by TfR1 and DMT1 localized on the apical side of the placental syncytiotrophoblasts, facing maternal circulation. On the other hand, fetal hepcidin would be expected to downregulate ferroportin on the basolateral side of these cells, facing fetal circulation. However, the predominant view is that fetal hepcidin does not significantly affect placental ferroportin in normal pregnancies simply because its concentration is very low [72]. Although fetal hepcidin mRNA expression has been shown to increase between E13.5 and E17.5, nevertheless, at the end of pregnancy (E17.5–E18.5), it was much lower than that of maternal liver hepcidin [20,60]. A recent study, in which mouse fetuses with a liver-specific knockout of the *Hamp* gene were analysed, clearly indicates that placental ferroportin is not regulated by fetal hepcidin under normal physiological conditions [20,70]. It is possible that under certain pathological conditions, i.e., in inflammation (which is known to increase hepcidin expression [73]) the level of fetal liver hepcidin is high enough to induce placental ferroportin degradation and thus inhibiting placental iron transport [74]. Such a possibility arises from the a study carried out on transgenic mouse fetuses (E15.5) ubiquitously overexpressing the *Hamp* gene, which showed severe iron deficiency anemia [21].

A similar phenotype has been found in the type II transmembrane serine protease matriptase-2-null fetuses at E17.5 [22]. Matriptase-2 (encoded by the *Tmprss6* gene) is a repressor of hepcidin expression operating through the proteolytic degradation of membrane hemojuvelin [75,76], which in turn acts as a co-receptor and is required to fully activate transcription of the *Hamp* gene through the BMP/SMAD (bone morphogenetic protein/sons of mothers against decapentaplegic) signalling pathway [77]. Adult *Tmprss6*^{−/−} mice were shown to excessively express the *Hamp* gene, leading to hypochromic, microcytic iron-deficiency anemia [75,78]). E17.5 *Tmprss6*^{−/−} fetuses showed a concerted pattern of regulations such as strongly up-regulated liver hepcidin and decreased placental ferroportin expression, total non-heme body iron, and red blood cell indices [22]. This study highlights the fundamental role of constitutively expressed matriptase-2 in hepcidin suppression in fetuses to ensure iron mobilization, preventing iron deficiency and anemia.

4. Heme-Related Genes in Mouse Prenatal Development

Heme, a ferrous iron protoporphyrin IX complex, is employed as a prosthetic group in diverse proteins that participate in important biological processes [79]. It is also involved in the transcriptional and translational regulation of the expression of numerous genes [80]. However, unbound heme is toxic due to its capacity to react with oxygen and catalyse the production of free radicals, which in turn may cause severe oxidative damage [81]. Therefore, the intracellular content of heme must be strictly regulated. One of the regulatory pathways is the enzymatic breakdown of heme molecules. In cells with an intensive heme metabolism such as erythroid cells and macrophages, *Hmox-1* encodes for heme oxygenase 1 (HO1), a multifunctional, inducible enzyme, acting at the interface between heme and non-heme iron metabolisms catalyses the rate-limiting step in the heme degradation pathway by cleaving the porphyrin ring, at the expense of molecular oxygen. This releases ferrous iron, carbon monoxide (CO), and biliverdin [82]. Disturbances in iron metabolism at various stages of postnatal development are well characterized consequences of the *Hmox1* gene deletion. The effects of this deletion include impaired heme recycling by tissue macrophages, intravascular hemolysis, and severe anemia [83–85]). Undoubtedly, HO1 is also crucial for supporting prenatal development already from the early stages. In

mice, HO1 expression has been found at the fetomaternal interface as early as the time of blastocyst implantation [23]. HO1 expression determines the attaching ability of blastocysts to endometrial epithelial cells and promotes the further formation of the placenta and its function. HO1 is markedly expressed in early embryos (HO-1 protein expression has been already shown in the ectoplacental cone in E6.5 embryos) and the placenta up to E14.5 and decreases towards the end of the pregnancy [23]. After placenta formation is completed on day E14.5, HO1 becomes restricted only to trophoblastic cells [86]. Murine invasive trophoblast is critically involved in placentation. It is not surprising therefore, that the deletion of the *Hmox1* gene leads to the abnormal placentation, inadequate remodelling of spiral arteries, intrauterine growth restriction, and eventually, to fetal lethality (reviewed in [87]). However, all these pathological consequences of HO1 deficiency seem unrelated to the misregulation of either cellular or systemic iron metabolism. Accordingly, the protective of HO1 effects on placentation and fetal growth can be mimicked by the exogenous administration of carbon monoxide (CO), a product of heme degradation catalysed by HO-1 [23].

It has been proposed that the placenta may utilize heme iron sources for fetal growth following the uptake of heme from the circulation [56]. Hemopexin is the protein produced mainly by the liver and released into plasma, where it binds heme with high affinity and acts primarily to deliver it to cells via CD91 receptor-mediated endocytosis [88]. During pregnancy, the high expression of CD91 in the placenta [88] may contribute substantially to the clearance of the heme-hemopexin complex from the circulation. The expression of HO1 in the placenta is well documented [87] and it is therefore likely that iron derived from the uptake of hemopexin-heme by CD91 is delivered to the fetus after heme degradation. However, the physiological relevance of this pathway is unclear and requires further study.

Another aspect of prenatal heme metabolism refers to the process of embryonic/fetal erythropoiesis. Erythropoiesis is the largest consumer of iron in the embryo/fetus during the prenatal period. It was estimated that in the mice fetuses between E12.5 and E16.5, the increase in red blood cell count is approximately 70-fold [89]. Erythropoiesis during development in utero is essential to supporting embryo survival, growth, and development of the embryo [90]. Murine intrauterine erythropoiesis consists of the primitive and definitive phases, both taking place in different sites of the embryo and fetus. Primitive erythropoiesis in the early fetal development, between E7.5 and E11.5, takes place entirely in the yolk sac blood islands. Definitive erythropoiesis begins during late fetal development, around E14.5 and occurs in the liver. Towards the end of gestation (E18.5), erythropoiesis passes from the liver to the bone marrow. Primitive and definitive erythropoiesis involve cell trafficking through erythroid progenitors, erythroblast precursors, and RBCs compartments.

The majority of heme (~85%) is synthesized in erythroid cells mainly for hemoglobin production. The heme biosynthetic pathway is composed of eight enzymes that work in either mitochondria or the cytoplasm. The terminal step of heme synthesis is the insertion of ferrous iron into the protoporphyrin IX macrocycle to produce protoheme IX (heme). This is catalysed by the enzyme ferrochelatase [91]. Growing evidence indicates that the tight control of cellular heme levels is not only achieved both by a fine balance between heme biosynthesis and catabolism via the enzyme heme oxygenase and also by specific transmembrane heme transporters [92]. Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor (FLVCR) was identified as a mammalian cell surface heme exporter that appears to protect erythroid progenitors from potential heme toxicity during the heme synthesis phase of erythropoiesis [93]. The critical importance of the *Flvcr* gene for prenatal erythropoiesis and its consequence for embryo/fetal development has been experimentally proven in the study, in which interbred *Flvcr*^{+/-} animals yielded no null offspring, attesting to the embryonic lethality of *Flvcr*^{-/-} embryos/fetuses [24]. Intrauterine deaths occurred at two distinct periods of embryonic development: at or before E7.5 and between E14.5 and E16.5, corresponding to primitive and definitive erythropoiesis occurring in the yolk sac and in the liver, respectively [94]. The fetal death during the latter period is possibly due to deficient red cell production attributed due to the blocking at the proerythroblast stage

(characterized by intensive heme synthesis), before hemoglobinization. It is hypothesized that FLVCR may protect proerythroblasts from heme toxicity, by expelling heme molecules into the extracellular environment [24].

5. Conclusions

There are still many more questions to answer about the regulation of iron homeostasis in prenatal life. In order to fully understand prenatal iron balance, it is crucial to distinguish between the mechanism and regulation of iron transport across the placenta, not only between maternal and fetal regulation but also between embryo proper vs. extraembryonic structures (such as embryonic part of the placenta and yolk sac). Although recent studies have revealed specific and unique molecules of iron transfer across the term placenta [10,56], it is clear that the supply of maternal iron to the embryo/fetus through immature placental structures at earlier stages of prenatal development should deserve our attention. Elucidating details of complex iron pathways during prenatal development can be greatly aided by mouse models with conditional knockout of genes in the placenta (or even in various placental cell types) but also mouse embryonic-extraembryonic chimaeras engineered to overexpress or to lack key iron metabolism genes in specific lineages and their derivatives. Similarly, many aspects of embryonic and fetal iron balance (for example, an adequate iron delivery for erythropoiesis occurring at different sites of the embryo/fetus) merit further investigations.

Author Contributions: Conceptualization, writing—original draft preparation Z.K. and P.L.; R.R.S., A.J. and R.M. writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant no. 2019/33/B/NZ9/02566 from the National Center of Science.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to Anna Piliszek for helpful comments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wilkinson, N.; Pantopoulos, K. IRP1 regulates erythropoiesis and systemic iron homeostasis by controlling HIF2 α mRNA translation. *Blood* **2013**, *122*, 1658–1669. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Katsarou, A.; Pantopoulos, K. Basics and principles of cellular and systemic iron homeostasis. *Mol. Aspects Med.* **2020**, *75*, 100866. [\[CrossRef\]](#)
3. Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **2011**, *283*, 65–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Ginzburg, Y.Z. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. *Vitam. Horm.* **2019**, *110*, 17–45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Ganz, T.; Nemeth, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1434–1443. [\[CrossRef\]](#)
7. Drakesmith, H.; Nemeth, E.; Ganz, T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 777–787. [\[CrossRef\]](#)
8. Zhang, Z.; Zhang, F.; Guo, X.; An, P.; Tao, Y.; Wang, F. Ferroportin1 in hepatocytes and macrophages is required for the efficient mobilization of body iron stores in mice. *Hepatology* **2012**, *56*, 961–971. [\[CrossRef\]](#)
9. Cao, C.; O'Brien, K.O. Pregnancy and iron homeostasis: An update. *Nutr. Rev.* **2013**, *71*, 35–51. [\[CrossRef\]](#)
10. Sangkhae, V.; Nemeth, E. Placental iron transport: The mechanism and regulatory circuits. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 254–261. [\[CrossRef\]](#)
11. Andrews, N.C. Iron homeostasis: Insights from genetics and animal models. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 208–217. [\[CrossRef\]](#)
12. Rossant, J.; Cross, J.C. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 538–548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ferreira, C.; Bucchini, D.; Martin, M.E.; Levi, S.; Arosio, P.; Grandchamp, B.; Beaumont, C. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3021–3024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Li, W.; Garringer, H.J.; Goodwin, C.B.; Richine, B.; Acton, A.; VanDuyn, N.; Muhoherac, B.B.; Irimia-Dominguez, J.; Chan, R.J.; Peacock, M.; et al. Systemic and cerebral iron homeostasis in ferritin knock-out Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Levy, J.E.; Jin, O.; Fujiwara, Y.; Kuo, F.; Andrews, N.C. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 396–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gunshin, H.; Fujiwara, Y.; Custodio, A.O.; DiRenzo, C.; Robine, S.; Andrews, N.C. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1258–1266. [[CrossRef](#)]
17. Donovan, A.; Lima, C.A.; Pinkus, J.L.; Pinkus, G.S.; Zon, L.I.; Robine, S.; Andrews, N.C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 191–200. [[CrossRef](#)]
18. Smith, S.R.; Ghosh, M.C.; Ollivierre-Wilson, H.; Hang Tong, W.; Rouault, T.A. Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. *Blood Cells Mol. Dis.* **2006**, *36*, 283–287. [[CrossRef](#)]
19. Sangkhae, V.; Fisher, A.L.; Chua, K.J.; Ruchala, P.; Ganz, T.; Nemeth, E. Maternal hepcidin determines embryo iron homeostasis in mice. *Blood* **2020**, *136*, 2206–2216. [[CrossRef](#)]
20. Kämmerer, L.; Mohammad, G.; Wolna, M.; Robbins, P.A.; Lakhal-Littleton, S. Fetal liver hepcidin secures iron stores in utero. *Blood* **2020**, *136*, 1549–1557. [[CrossRef](#)]
21. Nicolas, G.; Bennoun, M.; Porteu, A.; Mativet, S.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Sirito, M.; Sawadogo, M.; Kahn, A.; Vaulont, S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4596–4601. [[CrossRef](#)]
22. Willemetz, A.; Lenoir, A.; Deschemin, J.C.; Lopez-Otin, C.; Ramsay, A.J.; Vaulont, S.; Nicolas, G. Matriptase-2 is essential for hepcidin repression during fetal life and postnatal development in mice to maintain iron homeostasis. *Blood* **2014**, *124*, 441–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zenclussen, M.L.; Casalis, P.A.; El-Mousleh, T.; Rebelo, S.; Langwisch, S.; Linzke, N.; Volk, H.D.; Fest, S.; Soares, M.P.; Zenclussen, A.C. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J. Pathol.* **2011**, *225*, 293–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Keel, S.B.; Doty, R.T.; Yang, Z.; Quigley, J.G.; Chen, J.; Knoblauch, S.; Kingsley, P.D.; De Domenico, I.; Vaughn, M.B.; Kaplan, J.; et al. A Heme Export Protein Is Required for Red Blood Cell Differentiation and Iron Homeostasis. *Science* **2008**, *319*, 825–828. [[CrossRef](#)]
25. Yang, X.; Lu, D.; Zhang, X.; Chen, W.; Gao, S.; Dong, W.; Ma, Y.; Zhang, L. Knockout of ISCA 1 causes early embryonic death in rats. *Anim. Model. Exp. Med.* **2019**, *2*, 18–24. [[CrossRef](#)]
26. Cossée, M.; Puccio, H.; Gansmuller, A.; Koutnikova, H.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Fischbeck, K.; Dollé, P.; Koenig, M. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 1219–1226. [[CrossRef](#)]
27. Rossant, J. Genetic control of early cell lineages in the mammalian embryo. *Annu. Rev. Genet.* **2018**, *52*, 185–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wigger, M.; Kisieleska, K.; Filimonow, K.; Plusa, B.; Maleszewski, M.; Suwińska, A. Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15136. [[CrossRef](#)]
29. Kojima, Y.; Tam, O.H.; Tam, P.P.L. Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *34*, 65–75. [[CrossRef](#)]
30. Hemberger, M.; Hanna, C.W.; Dean, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21*, 27–43. [[CrossRef](#)]
31. Nomizu, T.; Falchuk, K.H.; Vallee, B.L. Zinc, iron, and copper contents of *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **1993**, *36*, 419–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhao, M.H.; Liang, S.; Kim, S.H.; Cui, X.S.; Kim, N.H. Fe(III) is essential for porcine embryonic development via mitochondrial function maintenance. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130791. [[CrossRef](#)]
33. Briggs, D.A.; Sharp, D.J.; Miller, D.; Gosden, R.G. Transferrin in the developing ovarian follicle: Evidence for de-novo expression by granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* **1999**, *5*, 1107–1114. [[CrossRef](#)]
34. Aleshire, S.L.; Osteen, K.G.; Maxson, W.S.; Entman, S.S.; Bradley, C.A.; Parl, F.F. Localization of transferrin and its receptor in ovarian follicular cells: Morphologic studies in relation to follicular development. *Fertil. Steril.* **1989**, *51*, 444–449. [[CrossRef](#)]
35. Arosio, P.; Levi, S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2010**, *1800*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Santana-Codina, N.; Mancias, J.D. The role of NCOA4-mediated ferritinophagy in health and disease. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 114. [[CrossRef](#)]
37. Levi, S.; Corsi, B.; Rovida, E.; Cozzi, A.; Santambrogio, P.; Albertini, A.; Arosio, P. Construction of a ferroxidase center in human ferritin L-chain. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30334–30339. [[CrossRef](#)]
38. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Meek, J.; Adamson, E.D. Transferrin in foetal and adult mouse tissues: Synthesis, storage and secretion. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **1985**, *86*, 205–218. [[CrossRef](#)]

40. Trenor, C.C.; Campagna, D.R.; Sellers, V.M.; Andrews, N.C.; Fleming, M.D. The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood* **2000**, *96*, 1113–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Knutson, M.D. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 101–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Yeo, J.H.; Colonne, C.K.; Tasneem, N.; Cosgriff, M.P.; Fraser, S.T. The iron islands: Erythroblastic islands and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2019**, *1863*, 466–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ward, P.P.; Mendoza, M.M.; Saucedo-Cardenas, O.; Teng, C.T.; Conneely, O.M. Restricted Spatiotemporal Expression of Lactoferrin during Murine Embryogenesis. In *Advances in Lactoferrin Research*; Springer: Boston, MA, USA, 1998; pp. 91–100. ISBN 9781475790689.
44. Suzuki, Y.A.; Lopez, V.; Lönnnerdal, B. Mammalian lactoferrin receptors: Structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2560–2575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Suzuki, Y.A.; Lönnnerdal, B. Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. *BioMetals* **2004**, *17*, 301–309. [[CrossRef](#)]
46. LaVaute, T.; Smith, S.; Cooperman, S.; Iwai, K.; Land, W.; Meyron-Holtz, E.; Drake, S.K.; Miller, G.; Abu-Asab, M.; Tsokos, M.; et al. Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 209–214. [[CrossRef](#)]
47. Galy, B.; Ferring, D.; Minana, B.; Bell, O.; Janser, H.G.; Muckenthaler, M.; Schümann, K.; Hentze, M.W. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood* **2005**, *106*, 2580–2589. [[CrossRef](#)]
48. Meyron-Holtz, E.G.; Ghosh, M.C.; Iwai, K.; LaVaute, T.; Brazzolotto, X.; Berger, U.V.; Land, W.; Ollivierre-Wilson, H.; Grinberg, A.; Love, P.; et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.* **2004**, *23*, 386–395. [[CrossRef](#)]
49. Bielinska, M.; Narita, N.; Wilson, D.B. Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* **1999**, *43*, 183–205. [[CrossRef](#)]
50. Christodoulou, N.; Weberling, A.; Strathdee, D.; Anderson, K.I.; Timpson, P.; Zernicka-Goetz, M. Morphogenesis of extra-embryonic tissues directs the remodelling of the mouse embryo at implantation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3557. [[CrossRef](#)]
51. Artus, J.; Douvaras, P.; Piliszek, A.; Isern, J.; Baron, M.H.; Hadjantonakis, A.K. BMP4 signaling directs primitive endoderm-derived XEN cells to an extraembryonic visceral endoderm identity. *Dev. Biol.* **2012**, *361*, 245–262. [[CrossRef](#)]
52. Fraser, S.T.; Baron, M.H. Embryonic fates for extraembryonic lineages: New perspectives. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 586–591. [[CrossRef](#)]
53. De Clercq, K.; Persoons, E.; Napso, T.; Luyten, C.; Parac-Vogt, T.N.; Sferruzzi-Perri, A.N.; Kerckhofs, G.; Vriens, J. High-resolution contrast-enhanced microCT reveals the true three-dimensional morphology of the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 13927–13936. [[CrossRef](#)]
54. Adamson, S.L.; Lu, Y.; Whiteley, K.J.; Holmyard, D.; Hemberger, M.; Pfarrer, C.; Cross, J.C. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. *Dev. Biol.* **2002**, *250*, 358–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hu, D.; Cross, J.C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.* **2010**, *54*, 341–354. [[CrossRef](#)]
56. Cao, C.; Fleming, M.D. The placenta: The forgotten essential organ of iron transport. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 421–431. [[CrossRef](#)]
57. Georgieff, M.K.; Wobken, J.K.; Welle, J.; Burdo, J.R.; Connor, J.R. Identification and localization of divalent metal transporter-1 (DMT-1) in term human placenta. *Placenta* **2000**, *21*, 799–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ponka, P.; Lok, C.N. The transferrin receptor: Role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 1111–1137. [[CrossRef](#)]
59. Sendamarai, A.K.; Ohgami, R.S.; Fleming, M.D.; Lawrence, C.M. Structure of the membrane proximal oxidoreductase domain of human Steap3, the dominant ferrireductase of the erythroid transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7410–7415. [[CrossRef](#)]
60. Mazgaj, R.; Lipiński, P.; Edison, E.S.; Bednars, A.; Staroń, R.; Haberkiewicz, O.; Lenartowicz, M.; Smuda, E.; Jończy, A.; Starzyński, R.R. Marginally reduced maternal hepatic and splenic ferroportin under severe nutritional iron deficiency in pregnancy maintains systemic iron supply. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, 659–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Yanatori, I.; Kishi, F. DMT1 and iron transport. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 55–63. [[CrossRef](#)]
62. Gambling, L.; Danzeisen, R.; Gair, S.; Lea, R.G.; Charania, Z.; Solanky, N.; Joory, K.D.; Kaila, S.; Srai, S.; McArdle, H.J. Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro. *Biochem. J.* **2001**, *356*, 883–889. [[CrossRef](#)]
63. Fleming, M.D.; Trenor, C.C.; Su, M.A.; Foernzler, D.; Beier, D.R.; Dietrich, W.F.; Andrews, N.C. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 383–386. [[CrossRef](#)]
64. Fleming, M.D.; Romano, M.A.; Maureen, A.S.U.; Garrick, L.M.; Garrick, M.D.; Andrews, N.C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1148–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wang, B.; He, L.; Dong, H.; Dalton, T.P.; Nebert, D.W. Generation of a Slc39a8 hypomorph mouse: Markedly decreased ZIP8 Zn²⁺/(HCO₃)₂ transporter expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *410*, 289–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Liuzzi, J.P.; Aydemir, F.; Nam, H.; Knutson, M.D.; Cousins, R.J. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13612–13617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Hojyo, S.; Fukada, T.; Shimoda, S.; Ohashi, W.; Bin, B.H.; Koseki, H.; Hirano, T. The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e018059. [\[CrossRef\]](#)
68. Bastin, J.; Drakesmith, H.; Rees, M.; Sargent, I.; Townsend, A. Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *Br. J. Haematol.* **2006**, *134*, 532–543. [\[CrossRef\]](#)
69. Mok, H.; Mendoza, M.; Prchal, J.T.; Balogh, P.; Schumacher, A. Dysregulation of ferroportin 1 interferes with spleen organogenesis in polycythaemia mice. *Development* **2004**, *131*, 4871–4881. [\[CrossRef\]](#)
70. Sangkhae, V.; Fisher, A.L.; Wong, S.; Koenig, M.D.; Tussing-Humphreys, L.; Chu, A.; Lelić, M.; Ganz, T.; Nemeth, E. Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 625–640. [\[CrossRef\]](#)
71. Tabbah, S.; Buhimschi, C.; Rodewald-Millen, K.; Pierson, C.; Bhandari, V.; Samuels, P.; Buhimschi, I. Hepcidin, an Iron Regulatory Hormone of Innate Immunity, is Differentially Expressed in Premature Fetuses with Early-Onset Neonatal Sepsis. *Am. J. Perinatol.* **2018**, *35*, 865–872. [\[CrossRef\]](#)
72. Fisher, A.L.; Nemeth, E. Iron homeostasis during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106*, 1567S–1574S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Wang, C.Y.; Babitt, J.L. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Curr. Opin. Hematol.* **2016**, *23*, 189–197. [\[CrossRef\]](#)
74. Fisher, A.L.; Sangkhae, V.; Presicce, P.; Chougnet, C.A.; Jobe, A.H.; Kallapur, S.G.; Tabbah, S.; Buhimschi, C.S.; Buhimschi, I.A.; Ganz, T.; et al. Fetal and amniotic fluid iron homeostasis in healthy and complicated murine, macaque, and human pregnancy. *JCI Insight* **2020**, *5*, 135321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Du, X.; She, E.; Gelbart, T.; Truksa, J.; Lee, P.; Xia, Y.; Khovananth, K.; Mudd, S.; Mann, N.; Moresco, E.M.Y.; et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* **2008**, *320*, 1088–1092. [\[CrossRef\]](#)
76. Silvestri, L.; Pagani, A.; Nai, A.; De Domenico, I.; Kaplan, J.; Camaschella, C. The Serine Protease Matriptase-2 (TMPRSS6) Inhibits Hepcidin Activation by Cleaving Membrane Hemojuvelin. *Cell Metab.* **2008**, *8*, 502–511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Babitt, J.L.; Huang, F.W.; Wrighting, D.M.; Xia, Y.; Sidis, Y.; Samad, T.A.; Campagna, J.A.; Chung, R.T.; Schneyer, A.L.; Woolf, C.J.; et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 531–539. [\[CrossRef\]](#)
78. Folgueras, A.R.; De Lara, F.M.; Pendás, A.M.; Garabaya, C.; Rodríguez, F.; Astudillo, A.; Bernal, T.; Cabanillas, R.; López-Otín, C.; Velasco, G. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* **2008**, *112*, 2539–2545. [\[CrossRef\]](#)
79. Ponka, P. Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* **1999**, *318*, 241–256. [\[CrossRef\]](#)
80. Furuyama, K.; Kaneko, K.; Vargas, P.D. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: Heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J. Exp. Med.* **2007**, *213*, 1–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Kumar, S.; Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* **2005**, *157*, 175–188. [\[CrossRef\]](#)
82. Kikuchi, G.; Yoshida, T.; Noguchi, M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 558–567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Poss, K.D.; Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10925–10930. [\[CrossRef\]](#)
84. Kovtunovych, G.; Eckhaus, M.A.; Ghosh, M.C.; Ollivierre-Wilson, H.; Rouault, T.A. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: Effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood* **2010**, *116*, 6054–6062. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Bednarz, A.; Lipiński, P.; Starzyński, R.R.; Tomczyk, M.; Kraszewska, I.; Herman, S.; Kowalski, K.; Gruca, E.; Jończy, A.; Mazgaj, R.; et al. Exacerbation of neonatal hemolysis and impaired renal iron handling in heme oxygenase 1-deficient mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7754. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Watanabe, S.; Akagi, R.; Mori, M.; Tsuchiya, T.; Sassa, S. Marked developmental changes in heme oxygenase-1 (HO-1) expression in the mouse placenta: Correlation between HO-1 expression and placental development. *Placenta* **2004**, *25*, 387–395. [\[CrossRef\]](#)
87. Zenclussen, M.L.; Linzke, N.; Schumacher, A.; Fest, S.; Meyer, N.; Casalis, P.A.; Zenclussen, A.C. Heme oxygenase-1 is critically involved in placentation, spiral artery remodeling, and blood pressure regulation during murine pregnancy. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 291. [\[CrossRef\]](#)
88. Hvidberg, V.; Maniecki, M.B.; Jacobsen, C.; Højrup, P.; Møller, H.J.; Moestrup, S.K. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* **2005**, *106*, 2572–2579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. McGrath, K.E.; Kingsley, P.D.; Koniski, A.D.; Porter, R.L.; Bushnell, T.P.; Palis, J. Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of “pyrenocytes” in the mammalian fetus. *Blood* **2008**, *111*, 2409–2417. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Palis, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 3. [\[CrossRef\]](#)
91. Dailey, H.A.; Meissner, P.N. Erythroid heme biosynthesis and its disorders. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, a011676. [\[CrossRef\]](#)
92. Khan, A.A.; Quigley, J.G. Control of intracellular heme levels: Heme transporters and heme oxygenases. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 668–682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Quigley, J.G.; Yang, Z.; Worthington, M.T.; Phillips, J.D.; Sabo, K.M.; Sabbath, D.E.; Berg, C.L.; Sassa, S.; Wood, B.L.; Abkowitz, J.L. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* **2004**, *118*, 757–766. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Baron, M.H.; Isern, J.; Fraser, S.T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* **2012**, *119*, 4828–4837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

RESEARCH

Open Access



Impact of litter size on the hematological and iron status of gilts, sows and newborn piglets: a comparative study of domestic pigs and wild boars

Zuzanna Kopeć¹ , Rafał Mazgaj¹ , Rafał Radosław Starzyński¹ , Xiuying Wang¹ , Jolanta Opiela² , Zdzisław Smorąg² , Barbara Gajda² , Jakub Nicpoń³, Małgorzata Lenartowicz⁴ , Magdalena Ogłuszka¹ , Mikołaj Antoni Gralak⁵ and Paweł Lipiński^{1*}

Abstract

Background The critically low hepatic iron stores of newborn piglets are considered to be a major cause of neonatal iron deficiency in modern breeds of domestic pig (*Sus domestica*). The main factor believed to contribute to this phenomenon is large litter size, which has been an objective of selective breeding of pigs for decades. As consequence, iron transferred from the pregnant sow has to be distributed among a greater number of fetuses.

Results Here, we investigated whether litter size influences red blood cell (RBC) indices and iron parameters in Polish Large White (PLW) piglets and gilts. Small and large litters were produced by the transfer of different numbers of embryos, derived from the same superovulated donor females, to recipient gilts. Piglets from large litters obtained following routine artificial insemination were also examined. Our results clearly demonstrated that varying the number of piglets in a litter did not affect the RBC and iron status of 1-day-old piglets, with all showing iron deficiency anemia. In contrast, gilts with small litters displayed higher RBC and iron parameters compared to mothers with large litters. A comparative analysis of the RBC status of wild boars (having less than half as many piglets per litter as domestic pigs) and PLW pigs, demonstrated higher RBC count, hemoglobin level and hematocrit value of both wild boar sows and piglets, even compared to small-litter PLW animals.

Conclusions These findings provide evidence that RBC and iron status in newborn PLW piglets are not primarily determined by litter size, and indicate the need to study the efficiency of iron transport across the placenta in domestic pig and wild boar females.

Keywords Domestic pig, Iron deficiency anemia, Litter size, Pregnant sows, Wild boar (*Sus scrofa* L.)

*Correspondence:

Paweł Lipiński
p.lipinski@igbzpan.pl

¹Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland

²National Research Institute of Animal Production, Balice, Poland

³Department of Surgery, Faculty of Veterinary Sciences, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland

⁴Laboratory of Genetics and Evolution, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Kraków, Poland

⁵Department of Physiological Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warszawa, Poland



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Early postnatal iron deficiency anemia (IDA) is a frequent disorder in mammals, but it only occurs regularly in domestic pigs [1, 2]. Hepatic iron reserves are the main source of this microelement to meet erythropoietic needs during early development [3]. It is not surprising therefore that critically low fetal/newborn hepatic iron stores, ranging between 50 and 70 mg iron [4], are considered a primary cause of IDA in suckling piglets. Moreover, considering the low iron concentration in the colostrum and milk of sows [4], the natural iron supply is clearly inadequate to satisfy iron requirements in rapidly growing piglets. For many decades, pigs have been bred for growth rate, and this has greatly increased their iron demand [1, 2, 5]. Large litter size and high birth weight of piglets are two further objectives of selective pig breeding that have very likely contributed to the paucity of iron stores [6]. In modern pig breeds, multiple gestations of more than 10 piglets are thought to exceed the physiological potential of sows to provide sufficient iron to their fetuses.

The aim of this study was to check whether the size of litters of Polish Large White (PLW) gilts influences red blood cell (RBC) indices and blood plasma iron parameters in both the gilts after farrowing and their 1-day-old newborn piglets. For this purpose we examined animals from small and large litters obtained by transfer of different number of embryos to recipient gilts as well as animals from large litters following artificial insemination. Since iron deficiency has not been reported in the offspring of wild boar, the ancestor of domesticated pigs, which typically have less than half as many piglets per litter compared to domestic pigs [7], another goal of this study was to compare the RBC and iron status of wild boars and PLW pigs from different sized litters. Our results challenge the well-established view that litter size in the domesticated pig determines RBC and iron status in newborn piglets. We also present the first experimental evidence that RBC status in wild boar sows and piglets is higher than that of domestic pigs, regardless of litter size.

Methods

Animal experimentation

Polish Large White pig

The experiment with PLW pigs was conducted at the Pig Experimental Station in Żerniki Wielkie, belonging to the National Research Institute of Animal Production (Balice, Poland). The sows and gilts were housed under standard conditions (70% humidity, temperature 22 °C) in gestation cages (2.2×0.65×1.8 m) with straw bedding. Females were placed in farrowing cages (2.4×3.4 m) on day 110 of gestation. Until parturition, females were offered the standard fodder for pregnant sows containing 120 mg Fe/kg, as estimated by flame spectrometry.

Obtaining small and large pig litters through regulated embryo transfer (ET)

This procedure was performed as previously described [8]. Importantly, in this study, the term ‘large litter’ was used solely for the purpose of contrasting with small litters. Specifically, litters of 14±2 and 12±1 piglets, obtained by artificial insemination and embryo transfer, respectively, represent the average litter size in the PLW breed [9]. In contemporary pig production, litters with 18–20 piglets do occur, objectively qualifying as large litters [10–13]. However, the frequency of such large litters in PLW pigs is relatively low [9]. Moreover, achieving litters of 18–20 piglets through embryo transfer technology is challenging.

Preparation of embryo donors

To obtain small and large litters, embryos were collected from PLW females for transfer to recipient animals. The embryo donors were fifteen 6-month-old gilts weighing 90–110 kg that were superovulated by intramuscular injection of 1500 I.U. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; Folligon, Intervet, Boxmeer, The Netherlands). After 72 h, the animals were injected with 1000 I.U. hCG (Human Chorionic Gonadotropin; Chorulon, Intervet, Boxmeer, The Netherlands). On the oestrus day, these females were inseminated twice at 12-hour intervals with a standard dose of semen.

Obtaining embryos at the 2–4 cell stage

Embryos were obtained 72–74 h after hCG injection by flushing each oviduct with 20 ml of PBS supplemented with BSA at 38 °C. The collected fluid was screened for embryos using a stereoscopic microscope. The embryos were then transferred to PBS supplemented with 20% FCS and morphological evaluation was carried out.

Preparation of embryo recipients

The embryo recipients were 6-month-old PLW gilts weighing approximately 90 kg. These females were synchronized by intramuscular injection of 750 I.U. PMSG. After 72 h, they were injected with 500 I.U. hCG. Symptoms of heat were observed after a further 24 h. ET was performed surgically on the 2nd day after the synchronized heat. Under full anesthesia, embryos were introduced into the fallopian tubes. The number of embryos per recipient animal depended on the experimental group: group I – 6–8 embryos each; group II – 14–16 embryos each. The effectiveness of the transfer was assessed by ultrasound scans of the recipients on the 30th and 45th day after ET, and based on the number of live piglets born. Using regulated ET we obtained large litters from five gilts and small litters from seven gilts of 10±1 and 4±2 piglets, respectively. Two piglets from each gilt were used, based on their body weight (litter average).

Obtaining large pig litters through artificial insemination (AI)

PLW piglets from large litters (14 ± 2 piglets) obtained from six 1-year-old sows by routine artificial insemination were also used. These piglets have been included in the study as control animals to rule out the potential effect of embryo transfer procedure on changes in RBC indices and iron parameters in newborn piglets. Two piglets from each sow were used, based on their body weight (litter average).

Wild boars

The experiment with wild boars was conducted at the Centre for Research into Forests and Game Breeding of Wrocław University of Environmental and Life Sciences (Złotów, Poland). Clinically healthy wild boars females captured in the forest of Trzebnica and Oleśnica County, Lower Silesian Voivodeship, were kept in semi-wild conditions on a forest farm monitored by 12 cameras that were used to track their behavior, particularly rutting, mating and preparations for farrowing. The farm was divided into three enclosures of approximately 1300 m² each. Two females were placed in each enclosure and a male boar was introduced for the mating period (November to January). The animals had *ad libitum* access to water and were fed maize grain, potatoes and fresh forage daily. The ground allowed for burrowing and other natural wild boar behaviors such as mud baths and scratching against tree trunks. For the experiment, six 1-2-year-old gilts and sows weighing 60–80 kg and their offspring (2 piglets from each gilt/sow) were used, based on their body weight (litter average).

Collection of blood, colostrum, and tissue samples

Before blood sampling, the wild boar females were premedicated by intramuscular injection (using a Palmer's weapon) of a mixture of methomidine (0.03 mg/kg b.w.), ketamine (9 mg/kg b.w.) and midanium (0.2 mg/kg b.w.). Blood from PLW and wild boar gilts/sows was drawn 24 h after farrowing by venipuncture of the jugular vein (*Vena jugularis externa*). The samples were centrifuged (1500×g, 10 min, 4 °C) to separate the plasma. Plasma samples were immediately aliquoted and stored at -80 °C.

One-day-old PLW and wild boar piglets were premedicated with 4 mg/kg azaperone (Stresnil, Elanco; 40 mg/mL) by intramuscular injection and blood was drawn by cardiac puncture. Following blood collection, the animals were immediately euthanized by 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).

To obtain colostrum samples (2–3 ml), PLW and wild boar females were hand milked into plastic tubes after ensuring the udder was clean.

Placental samples were collected from the maternal-chorioallantoic interface at each horn, immediately after its expulsion, then washed with PBS. Livers were excised from piglets after laparotomy. All tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C prior to analysis.

Measurement of red blood cell (RBC) indices and blood plasma iron parameters

RBC indices were determined using an IDEXX ProCyt Dx, an automated hematology analyzer (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA). Plasma iron level and plasma ferritin concentration were evaluated with a COBAS INTEGRA 400 plus biochemical analyzer (Roche Diagnostics, CH-6343 Rotkreuz, Switzerland).

Measurement of iron content in placenta, liver and colostrum samples

The non-heme hepatic and placental iron content was determined by acid digestion of the samples at 100 °C for 10 min, followed by colorimetric measurement of an iron-ferrozine complex (absorbance at 560 nm, Beckman DU-68) as described previously [14].

A 20 µL sample of colostrum was diluted in 2 ml of boiling Suprapur-grade nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany). The total iron concentration was then measured using the graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (AAS) technique (AAAnalyst 800, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Three samples of a standard reference material (197.94 ± 0.65 Fe mg/kg), were analyzed for normalization of the obtained data.

Measurement of Hepcidin-25 levels in blood plasma

A commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [DRG Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA Kit; DRG Instruments GmbH, Germany] was used for quantification of the hepcidin level in blood plasma.

Statistical analyses

The results are presented as means $\pm$ SD (standard deviation). Before comparison of means, Levene's test was performed for the assessment of the equality of group variances. For all presented results it was negative. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical evaluation of data and the Scheffe test ($p < 0.05$) was applied post-hoc.

Results and discussion

Improvement of reproductive traits, including litter size has been one of the main goals of pig breeders over the last century. However, increasing the number of piglets per litter has raised questions concerning the biological limits of pregnant sows to provide sufficient amounts of nutrients to their numerous offspring. Indeed, iron

deficiency is the most common disorder in the neonatal period in domestic pigs, resulting in severe iron deficiency anemia [1, 2]. Interestingly, no cases of iron deficiency have been recorded in the offspring of wild boar (*Sus scrofa* L.), the ancestor of domesticated pigs, suggesting that iron metabolism is well balanced in these animals. A possible explanation for this discrepancy is that during pregnancy, iron transferred from the domestic pig mother has to be distributed among typically more than 10 fetuses, compared to 4–6 in a wild boar sow.

In this study, we attempted to clarify whether litter size is a factor affecting the RBC and iron status of 1-day-old Polish Large White (PLW) piglets and their mothers. Our results clearly demonstrated that PLW piglets from litters of various sizes showed similar (not statistically different) values of RBC indices that are indicative of IDA [15, 16], which contrasts with the higher, physiological RBC status of wild boar piglets (Fig. 1A–C). This suggests that pregnant domestic pig gilts, even those having a small number of piglets in the litter (4–6), are unable to provide

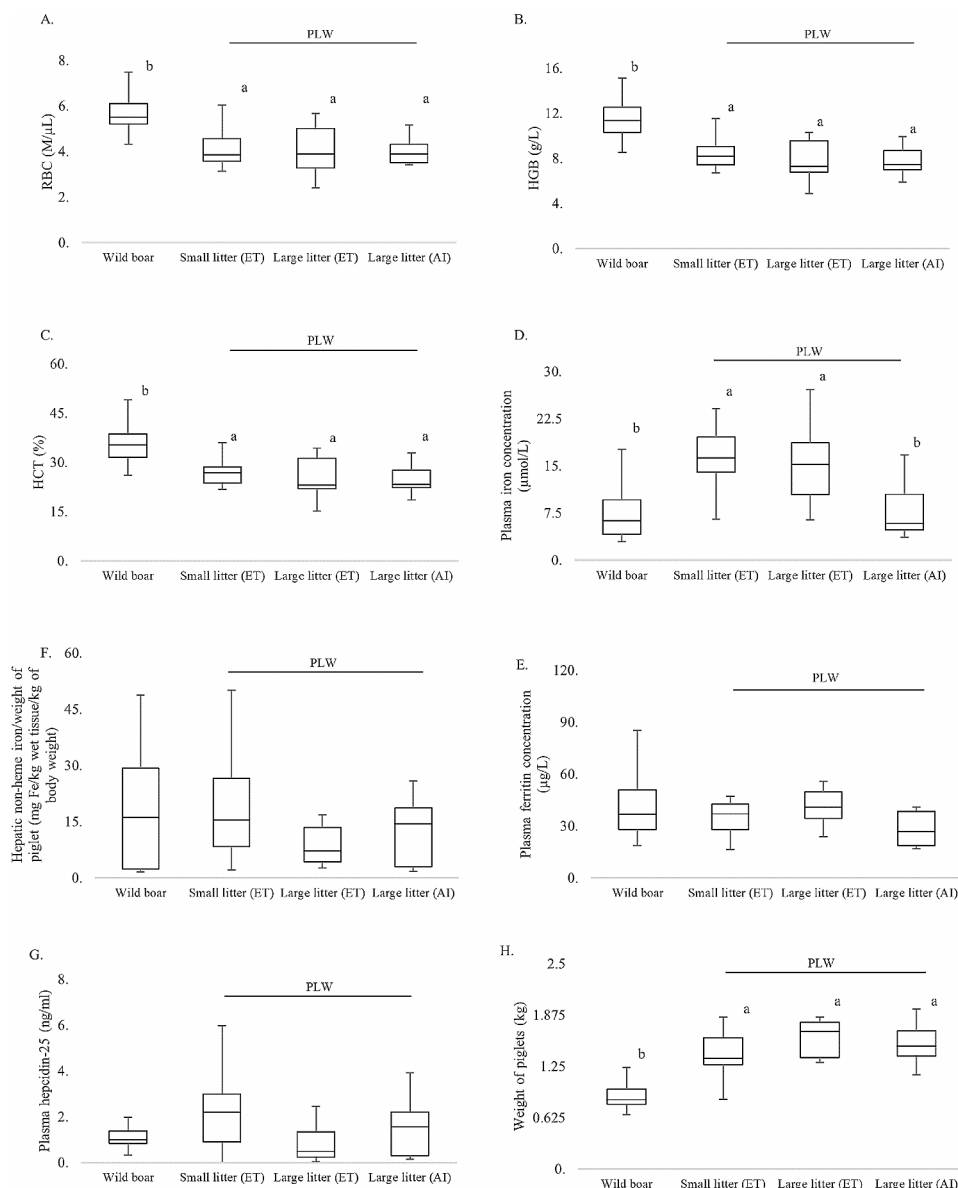


Fig. 1 Red blood cell (RBC) and iron metabolism parameters in 1-day-old wild boar and PLW piglets from litters of different sizes. Piglets were allocated into four experimental groups: (i) Wild boar, $n = 12$; (ii) PLW small litter after embryo transfer (ET), $n = 15$; (iii) PLW large litter after ET, $n = 10$; (iv) PLW large litter after artificial insemination (AI), $n = 12$. **(A)** RBC count; **(B)** Hemoglobin (Hgb) concentration; **(C)** Hematocrit (Hct) value; **(D)** Blood plasma iron concentration; **(E)** Blood plasma ferritin concentration; **(F)** Relative hepatic non-heme iron content; **(G)** Blood plasma hepcidin-25 concentration; **(H)** Weight of piglet. Within each box, horizontal lines denote median values. Boxes extend from the 25th to the 75th percentile of each group's distribution of values. Vertical extending lines denote adjacent values (i.e. the most extreme values within a 1.5 interquartile range of the 25th and 75th percentile for each group). Different letters indicate experimental groups between which statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were found

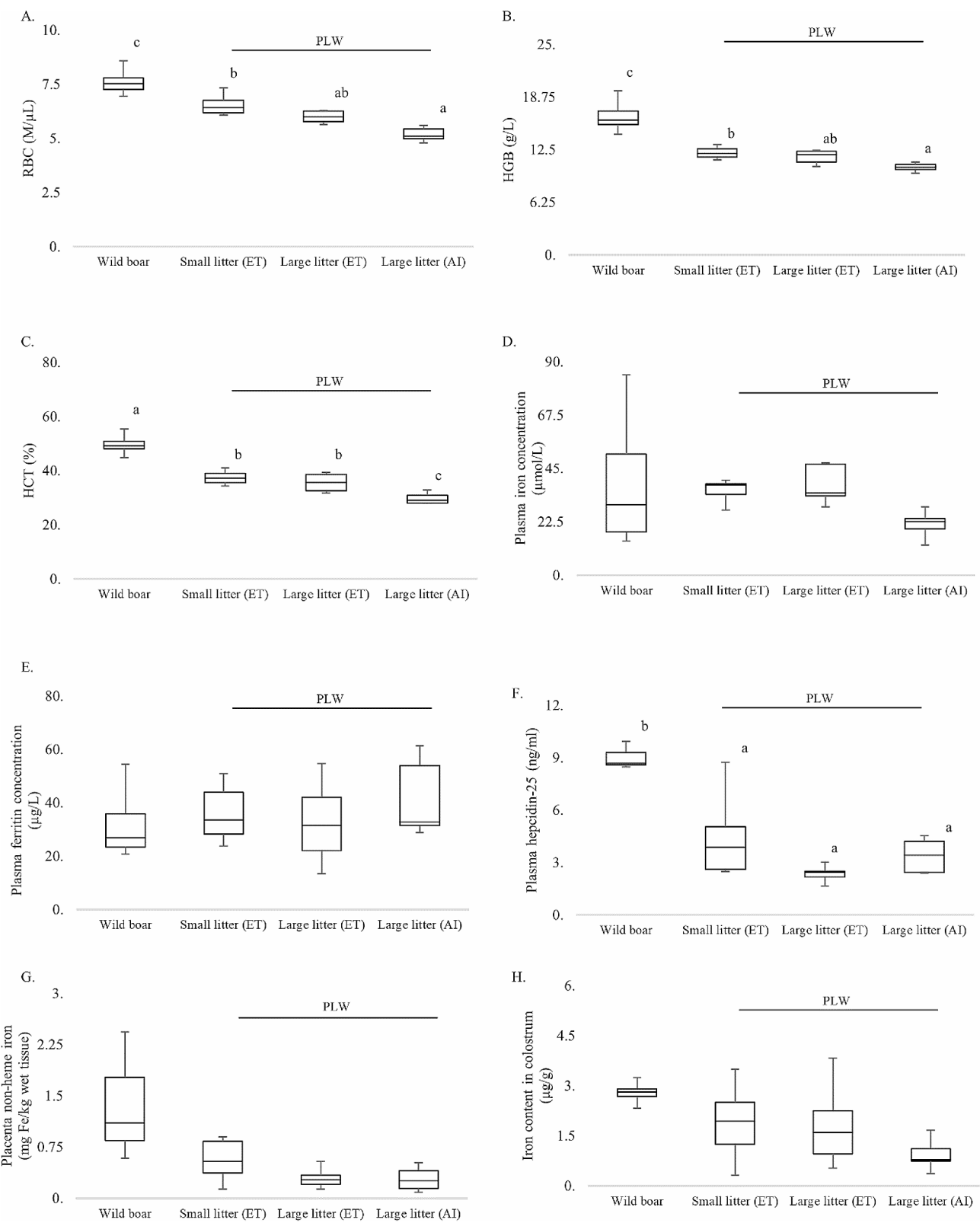


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 2 Red blood cell (RBC) and iron metabolism parameters in wild boar and PLW females with litters of different sizes. Females were allocated into four experimental groups: (i) Wild boar, $n=6$; (ii) PLW small litter after embryo transfer (ET), $n=7$; (iii) PLW large litter after ET, $n=5$; (iv) PLW large litter after artificial insemination (AI), $n=6$. RBC indices were determined for females from each group 24 h after farrowing: (A) Red blood cell (RBC) count; (B): Hemoglobin (Hgb) concentration; (C) Hematocrit (Hct) value; (D) Blood plasma iron concentration; (E) Blood plasma ferritin concentration; (F) Blood plasma hepcidin-25 concentration; (G) Placental non-heme iron content; (H) Total iron content in the colostrum. Within each box, horizontal lines denote median values. Boxes extend from the 25th to the 75th percentile of each group's distribution of values. Vertical extending lines denote adjacent values (i.e. the most extreme values within a 1.5 interquartile range of the 25th and 75th percentile for each group). Different letters indicate experimental groups between which statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were found

across the placenta sufficient amounts of iron to meet the erythropoietic needs of their progeny. Surprisingly, the blood plasma iron levels detected in wild boar piglets were significantly lower than those of PLW piglets, irrespective of the litter size (Fig. 1D). This may be due to the greater dynamics of erythropoiesis in wild boar piglets, and thus the more vigorous uptake of transferrin-bound iron by erythroid progenitor cells in the bone marrow. Importantly, evaluation of hepatic iron reserves by both direct measurement of hepatic non-heme iron (Fig. 1F) and determination of blood plasma ferritin concentration (Fig. 1E) showed no statistically significant differences between wild boar and PLW piglets. Similarly, no differences were found in the plasma level of hepcidin (Fig. 1G), the liver-derived peptide that blocks iron efflux from iron-recycling macrophages in the liver, and from iron-storing hepatocytes [17]. Taken together, these results suggested that hepatic iron sources contribute to systemic iron availability to the same extent in both wild boar and PLW piglets.

As in piglets, the RBC status was also significantly increased in wild boar mothers compared to PLW gilts, including those having only 4–6 piglets per litter, i.e. equivalent to typical wild boar litters (Fig. 2A–C). It is unlikely that the higher RBC indices in wild boar sows evaluated ~24 h after farrowing are a consequence of greater nutritional iron availability during pregnancy, considering that these animals ingested iron mainly from the soil and corn grain, whereas PLW gilts received iron-enriched feed containing 120 mg Fe/kg in the form of $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. It is, however, conceivable that the balanced RBC status of wild boar females (even when compared to PLW gilts with small litters) results from the smaller iron demand due to the much lower body weight of their newborn piglets (wild boar ~0.8 kg *versus* PLW ~1.4 kg, Fig. 1H) and the females themselves (60–70 kg *versus* 90–110 kg). It should be emphasized that although RBC status of PLW gilts from all experimental groups was decreased, it remained within the range of physiological values [18] and did not indicate IDA (Fig. 2A–C). Therefore, it is not surprising that the plasma iron parameters (iron and ferritin levels) were similar in both wild boar and PLW mothers (Fig. 2D–E). It is likely that the maintenance of this iron status in PLW gilts requires enhanced iron absorption from the diet as well as iron recycling by macrophages. It is tempting to propose that these two

processes are facilitated by the significantly lower concentration of hepcidin in the plasma of PLW gilts compared to wild boar mothers (Fig. 2F). The equivalent iron status of wild boar and PLW females from all experimental groups is also reflected in the similar iron contents in the colostrum (Fig. 2H).

Intriguingly, we observed that, in contrast to PLW piglets, litter size significantly influenced basic RBC indices of PLW gilts. RBC count, Hgb concentration and Hct values were all significantly higher in gilts having a small number of piglets compared to those with large litters especially obtained following routine artificial insemination (Fig. 2A–C). In this context, it is worth noting that iron metabolism during pregnancy is adjusted to meet the essential iron requirements of the fetus at the expense of the mother [19–21]. This is why we hypothesize that the reduced RBC status of PLW gilts with large litters results from preferential iron transport across the placenta to satisfy the greater total iron requirements of numerous fetuses. It should be noted that we did not determine RBC and iron status of gilts before performing ET procedure. Potential differences between gilts having large and small litters could influence their parameters after farrowing. However, this seems unlikely considering that these recipient gilts were closely related, the same age, housed in the same conditions, and given the same diet. Anyway, the lack of these results could be a limitation of our study.

Our findings raise questions concerning the comparative efficiency of transplacental iron delivery in wild boar and domestic pig females. Considering that iron content in the placenta tends to be higher in wild boar compared to PLW females regardless of litter size (Fig. 2G), it is tempting to speculate that at least iron transport across the apical side of the placenta is more effective in the former animals. Experiments are in progress in our lab to evaluate the molecular potential of iron delivery across the placenta of females from all experimental groups used in this study.

Conclusion

Large litter size, which has long been an objective of selective breeding of domestic pigs, was thought to limit the hepatic iron stores of newborn piglets, which contributes to iron deficiency anemia. We provide evidence that RBC and iron status in newborn PLW piglets are not

determined by litter size. Furthermore, comparison of the RBC status of wild boar and PLW piglets, irrespective of litter size, shows the better performance of wild neonates. Our results demonstrate that litter size is not a critical factor responsible for the anemic state of newborn piglets, at least in PLW breed.

Abbreviations

PLW	Polish Large White
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
hCG	Human chorionic gonadotropin
PBS	Phosphate buffered saline
BSA	Bovine serum albumin
FCS	Fetal calf serum
ET	Embryo transfer
AI	Artificial insemination

Acknowledgements

We thank Andrzej Kuźma and Joanna Abramczyk for the collection of blood, colostrum and placenta samples from PLW sows/gilts. We also thank John Gittins for a critical reading and English editing of the paper prior to submission.

Author contributions

Conceptualization, PL; Writing original draft, PL, ZK; Writing review & editing, ZK, RRS, JO, ZS; Performing embryo transfer, ZS, BG; Collecting biological samples and performing laboratory analyses, RM, XW, ZK, ML, MO, JN, RRS; Statistical analysis, MAG.

Funding

This work was supported by grant no. 2019/33/B/NZ9/02566 from the National Center of Science.

Data availability

All data analyzed during this study are included in this manuscript. The raw data are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Use of animals in the experiment and all procedures were approved by the Local Ethical Committee on Animal Testing at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences (experiment on wild boar; permission number: 081/2020/P1) and the Second Local Ethical Committee on Animal Testing in Kraków (experiment on PLW pigs; permission no. 399/2020). All procedures were conducted according to the guidelines of the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Use of pigs in the experiment and all procedures were approved by National Research Institute of Animal Production the owner of Experimental Station in Żerniki Wielkie. Use of wild boar in the experiment and all procedures were approved by Wrocław University of Environmental and Life Sciences the owner of Centre for Research into Forests and Game Breeding.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 5 May 2023 / Accepted: 31 January 2024

Published online: 23 February 2024

References

1. Svoboda M, Drábek J. Iron Deficiency in Suckling piglets: Etiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Vet.* 2005;49:104–11.
2. Szudzik M, Starzyński RR, Jorńczy A, Mazgaj R, Lenartowicz M, Lipiński P. Iron supplementation in suckling piglets: an ostensibly easy therapy of neonatal iron deficiency anemia. *Pharmaceuticals.* 2018; 11:128.
3. Gambling L, Czopek A, Andersen HS, Holtrop G, Srai SKS, Krejpcio Z, et al. Fetal iron status regulates maternal iron metabolism during pregnancy in the rat. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:1063–70.
4. Venn JAJ, McCance RA, Widdowson EM. Iron metabolism in piglet anaemia. *J Comp Pathol Ther.* 1947;57:314–25.
5. Kim JC, Wilcock P, Bedford MR. Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: a review. *Anim Feed Sci Technol.* 2018;235:8–14.
6. Mahan DC, Watts MR, St-Pierre N. Macro- and micromineral composition of fetal pigs and their accretion rates during fetal development. *J Anim Sci.* 2009;87:2823–32.
7. Fernández-Llario P, Mateos-Quesada P. Body size and reproductive parameters in the wild boar *Sus scrofa*. *Acta Theriol.* 1998;43:439–44.
8. Poniedziałek-Kempny K, Gajda B, Rajska I, Gajda L, Smorąg Z. Piglets produced by transfer of embryos obtained by in vitro fertilization of oocytes matured in vitro with thymosin: a case report. *Medycyna Weterinarnajna.* 2020;76:6356–2020.
9. Nowak B, Mucha A, Moska M, Kruszyński W. Reproduction indicators related to litter size and Reproduction cycle length among sows of breeds considered maternal and Paternal Components kept on medium-size farms. *Animals.* 2020;10:1164.
10. Björkman S, Oliviero C, Rajala-Schultz PJ, Soede NM, Peltoniemi O, a. T. The effect of litter size, parity and farrowing duration on placenta expulsion and retention in sows. *Theriogenology.* 2017;92:36–44.
11. Kemp B, Da Silva CLA, Soede NM. Recent advances in pig reproduction: focus on impact of genetic selection for female fertility. *Reprod Domest Anim.* 2018;53(Suppl 2):28–36.
12. Thorsen CK, Schild S-LA, Rangstrup-Christensen L, Bilde T, Pedersen LJ. The effect of farrowing duration on maternal behavior of hyperprolific sows in organic outdoor production. *Livest Sci.* 2017;204:92–7.
13. Oliviero C. Offspring of hyper prolific sows: immunity, birthweight, and heterogeneous litters. *Mol Reprod Dev.* 2023;90:580–4.
14. Torrance J, Bothwell T. Tissue iron stores. Iron (methods in Hematology). New York: Churchill Livingstone; 1980. pp. 90–115.
15. Egeli AK, Framstad T, Morberg H. Clinical Biochemistry, Haematology and Body Weight in piglets. *Acta Vet Scand.* 1998;39:381–93.
16. Kegley EB, Spears JW, Flowers WL. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig. *Nutr Res.* 2002;22:1209–17.
17. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22.
18. Oven IG, Svete AN, Hajdinjak M, Plut J, Stukelj M. Haematological profiles of pigs on different farms. Reflect Their Health Status. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-644732/v1>.
19. Gambling L, Lang C, McArdle HJ. Fetal regulation of iron transport during pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2011;94:1903–7.
20. Sangkhav V, Fisher AL, Wong S, Koenig MD, Tussing-Humphreys L, Chu A, et al. Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. *J Clin Invest.* 2020;130:625–40.
21. Mazgaj R, Lipiński P, Edison ES, Bednarz A, Staroń R, Haberkiewicz O, et al. Marginally reduced maternal hepatic and splenic ferroportin under severe nutritional iron deficiency in pregnancy maintains systemic iron supply. *Am J Hematol.* 2021;96:659–70.

Publisher's Note

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



Article

Comparison of Molecular Potential for Iron Transfer across the Placenta in Domestic Pigs with Varied Litter Sizes and Wild Boars

Zuzanna Kopec¹ , Rafał Radosław Starzyński¹ , Małgorzata Lenartowicz², Małgorzata Grzesiak³ , Jolanta Opiela⁴, Zdzisław Smorąg⁴, Barbara Gajda⁴, Jakub Nicpoń⁵, Magdalena Ogłuszka⁶ , Xiuying Wang¹ , Rafał Mazgaj¹ , Adrian Stankiewicz¹, Wiktoria Płonka², Natalia Pirga-Niemiec², Sylwia Herman² , and Paweł Lipiński^{1,*}

- ¹ Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzębiec, Poland; z.kopec@igbzpan.pl (Z.K.)
- ² Laboratory of Genetics and Evolution, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, 31-007 Kraków, Poland
- ³ Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, 31-007 Kraków, Poland
- ⁴ National Research Institute of Animal Production, 32-083 Balice, Poland
- ⁵ Department of Surgery, Faculty of Veterinary Sciences, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Poland
- ⁶ Department of Genomics, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzębiec, Poland
- * Correspondence: p.lipinski@igbzpan.pl



Citation: Kopec, Z.; Starzyński, R.R.; Lenartowicz, M.; Grzesiak, M.; Opiela, J.; Smorąg, Z.; Gajda, B.; Nicpoń, J.; Ogłuszka, M.; Wang, X.; et al. Comparison of Molecular Potential for Iron Transfer across the Placenta in Domestic Pigs with Varied Litter Sizes and Wild Boars. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9638. <https://doi.org/10.3390/ijms25179638>

Academic Editor: Giovanni Tossetta

Received: 30 July 2024

Revised: 29 August 2024

Accepted: 2 September 2024

Published: 5 September 2024



Copyright: © 2024 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Neonatal iron deficiency anemia is prevalent among domestic pigs but does not occur in the offspring of wild boar. The main causes of this disorder in piglets of modern pig breeds are paucity of hepatic iron stores, high birth weight, and rapid growth. Replenishment of fetal iron stores is a direct result of iron transfer efficiency across the placenta. In this study, we attempted to investigate the molecular potential of iron transfer across the placenta as a possible cause of differences between wild boar and Polish Large White (PLW) offspring. Furthermore, by analyzing placentas from PLW gilts that had litters of different sizes, we aimed to elucidate the impact of the number of fetuses on placental ability to transport iron. Using RNA sequencing, we examined the expression of iron-related genes in the placentas from wild boar and PLW gilts. We did not reveal significant differences in the expression of major iron transporters among all analyzed placentas. However, in wild boar placentas, we found higher expression of copper-dependent ferroxidases such as ceruloplasmin, zyklopen, and hephaestin, which facilitate iron export to the fetal circulation. We also determined a close co-localization of ceruloplasmin and zyklopen with ferroportin, the only iron exporter.

Keywords: placenta; iron deficiency anemia (IDA); litter size; copper-dependent ferroxidases; domestic pig; wild boar

1. Introduction

Early postnatal iron-deficiency anemia (IDA) is a common disorder in mammals, but it is consistently observed only in domestic pigs [1,2]. Numerous factors contribute to IDA in piglets of contemporary high-performance breeds, with key determinants including low hepatic iron stores, high birth weight, and rapid piglet growth [1,3]. Considering that iron reserves constitute a major source of this microelement for the development of mammalian neonates [4], it seems that the low content of hepatic iron (presumably the lowest among mammalian newborns [1,5]) accumulated during the fetal period is an initial and primary cause of IDA in newly born piglets. It has long been thought that this phenomenon is due to the physiological inability of pregnant sows to deliver sufficient

amount of iron to fetal livers, and thus to meet the iron demand for the growing number of fetuses. Indeed, reproductive efficiency is an important economic goal in the swine industry, and the selection for increased litter size over the past few decades has been one of the main objectives in pig breeding in many countries [6–8]. Interestingly, the results of our recent study clearly demonstrate that varying the number of Polish Large White (one of the two principal maternal pig breeds in Poland) piglets in a litter by embryo transfer does not affect the hepatic iron content and red blood cell (RBC) status of one-day-old piglets, all showing signs of iron deficiency [9]. We also presented the first experimental evidence that RBC status in wild boar piglets is higher than that in PLW piglets, regardless of the litter size they come from [9]. The optimal transfer of iron across the placenta is essential for fetal development in utero and for the establishment of adequate birth iron stores to sustain growth in early infancy. In this context, a question arises about the potential limitations in the functioning of complex mechanisms of iron transport across the placenta in domestic pig females. Therefore, in the present study, we attempted to compare the expression pattern of iron-related genes in the placenta between wild boar and PLW females of different litter sizes, including small litters equivalent to typical wild boar ones. Multiple maternal, placental, and fetal regulatory mechanisms are involved in the control of iron transport through the placenta [10,11]. Animal model studies indicate that especially in conditions of iron deficiency during pregnancy, iron is preferentially delivered, at the expense of the mother, to maintain not only fetal growth but also iron-dependent placental processes that are indispensable for the overall functioning of this organ [12,13]. In the term mouse/human placenta, the unidirectional iron flux to the fetal circulation is mediated by polarized syncytiotrophoblasts (SCTB) [14,15]. Diferric transferrin (Tf-Fe_2) from the maternal circulation binds to transferrin receptor 1 (TfR1) located on the apical (maternal) surface of syncytiotrophoblasts (SCTB) and is taken up by these cells via clathrin-mediated endocytosis. Inside the cell, specialized endosomes are formed and subsequently acidified by a proton pump. At pH 5.5, ferric (Fe^{3+}) iron is released from transferrin molecules, reduced to the ferrous state (Fe^{2+}) by an oxidoreductase (potentially Steap3) [16], and is then transported to the cytoplasm via divalent metal transporter 1 (DMT1) [17]. Once in the cytoplasm, iron can be stored in ferritin (Ft) [18], used for iron–sulfur cluster biogenesis and heme synthesis, or exported to the fetal circulation by ferroportin (Fpn) [19]. Iron export from SCTB requires one of the multicopper ferroxidases, with zyklopen (Zp), hephaestin (Heph), and/or ceruloplasmin (Cp) being likely candidates, which oxidize Fe^{2+} to Fe^{3+} prior to iron binding by fetal transferrin in the blood [20,21].

The aim of our study was to compare the molecular mechanisms of placental iron transfer in wild boar and Polish Large White (PLW) females, particularly in the context of neonatal iron deficiency anemia (IDA) occurring in domestic pigs but not in wild boars [9]. Additionally, we aimed to check whether a large number of piglets in the litter of domestic pig females entails enhancement of transplacental iron transport. We sought to solve this issue by analyzing the expression of iron-related genes in the placentas of PLW females with different-size litters.

Although neonatal IDA in domestic piglets is well documented [1–3], there are no studies focused on the efficiency of molecular mechanisms of transplacental iron transfer as a potential causative factor underlying this phenomenon. Our knowledge of molecular mechanisms involved in placental iron transfer in *Sus* species is very poor [22]. In particular, their impact on the occurrence of IDA in suckling piglets of modern breeds remains unclear. We hypothesize that the potential of transplacental iron transfer in wild boar females shaped during evolution remained unchanged in domestic pig females of contemporary high-performance breeds and turned out to be insufficient to provide enough iron to a larger number of heavier piglets.

In this study, we employed RNA sequencing (RNA-seq) to compare for the first time the expression of genes involved in transplacental iron transfer between wild boar and PLW females with varying litter sizes. Our study provides new insights into the role of copper-dependent ferroxidases, such as ceruloplasmin, zyklopen, and hephaestin, in iron

export efficiency to fetal circulation. RNA-seq data, confirmed by RT quantitative PCR (RT-qPCR), indicated that among iron-related genes, only those encoding multicopper ferroxidases were highly expressed in wild boar placentas compared to those in PLW placentas. Immunofluorescence analysis revealed enhanced fluorescent signals for ceruloplasmin (Cp) in the apical membrane of the luminal epithelial cells in the wild boar placenta. Co-localization studies showed overlap in the staining of Cp and zyklopen (Zp) with ferroportin (Fpn), the known exporter of non-heme iron [11,23].

Although we did not detect any major differences in the molecular potential to transfer iron through the placenta between wild boar and domestic PLW pig, our data suggest that especially Cp may contribute to more efficient iron flow across the placenta in wild boars compared to that in PLW females, regardless of their litter size.

2. Results

2.1. NGS-Based RNA-Seq Analysis of Wild Boar and PLW Placentas from Females Having Litters of Different Sizes

Through the analysis of RNA-seq data, we identified statistically significant differences in gene expression between the placentas of the wild boar and domestic pig groups. Volcano plots were employed to delineate genes with expression changes exceeding a fivefold difference between the placentas of wild boars and domestic pigs groups (Figure S1A–F). Among placentas of wild boars and PLW females with small litters after embryo transfer (ET), we observed differential expression in 164 genes, with 138 upregulated and 26 downregulated. Pronounced expression disparities were noted between the placentas of wild boar and PLW females with large litters after ET, involving 402 genes, with 94 upregulated and 308 downregulated. Conversely, the least variation in gene expression occurred between the placentas of wild boars and PLW females with large litters after artificial insemination (AI), encompassing 82 genes, with 46 upregulated and 36 downregulated. Regarding gene expression differences in domestic pigs with different litter sizes, only singular alterations were noted: one gene was downregulated in the large litter (AI) vs. small litter (ET), one gene was upregulated in the large litter (AI) vs. large litter (ET), and one gene was downregulated (Table 1).

Table 1. Differentially expressed genes (DEGs) in the placentas of wild boars and PLW pigs.

Comparison between Experimental Groups	Number of Significantly Changed Genes		
	Total	Upregulated	Downregulated
Small litter (ET) vs. wild boar	164	138	26
Large litter (ET) vs. wild boar	402	94	308
Large litter (AI) vs. wild boar	82	46	36
Large litter (ET) vs. small litter (ET)	0	0	0
Large litter (AI) vs. small litter (ET)	1	0	1
Large litter (AI) vs. large litter (ET)	2	1	1

ET—embryo transfer, AI—artificial insemination, padj < 0.05 adjusted *p*-value.

The RNA-seq data analysis revealed significant differences in gene expression between the placentas of wild boar and PLW females, with the most pronounced changes observed between wild boar and PLW females having large litters obtained through embryo transfer (ET). In contrast, differences in gene expression among PLW females with different litter sizes were minimal, with only a few single-gene expression changes noted between domestic pig groups.

2.2. Lack of Major Changes in the Placental Expression of Main Iron Transporters and L-Ferritin between Wild Boar and PLW Gilts

Although our RNA-seq analysis did not reveal any statistically significant differences in the expression of genes encoding for iron transporters and ferritin between the placentas from different experimental groups (the log2FoldChange values showed minimal variation,

and the corresponding adjusted p -values (padj) obtained from the DESeq analysis were above 0.05), we considered it important to assess their protein and/or mRNA levels by Western blotting and/or RT-qPCR. The protein levels of L-ferritin (L-Ft) (Figure 1A) and ferroportin (Fpn) (Figure 1B) in the placenta showed no significant differences between wild boar and PLW mothers. In contrast, wild boar females exhibited higher placental DMT1 protein levels, but only in comparison to PLW gilts having small litters after ET (Figure 1C). The expression of transferrin receptor 1 (TfR1), responsible for iron loading to the placenta from the maternal circulation, assessed at the mRNA level by RT-qPCR, showed no statistically significant differences between all examined groups (Figure 1D).

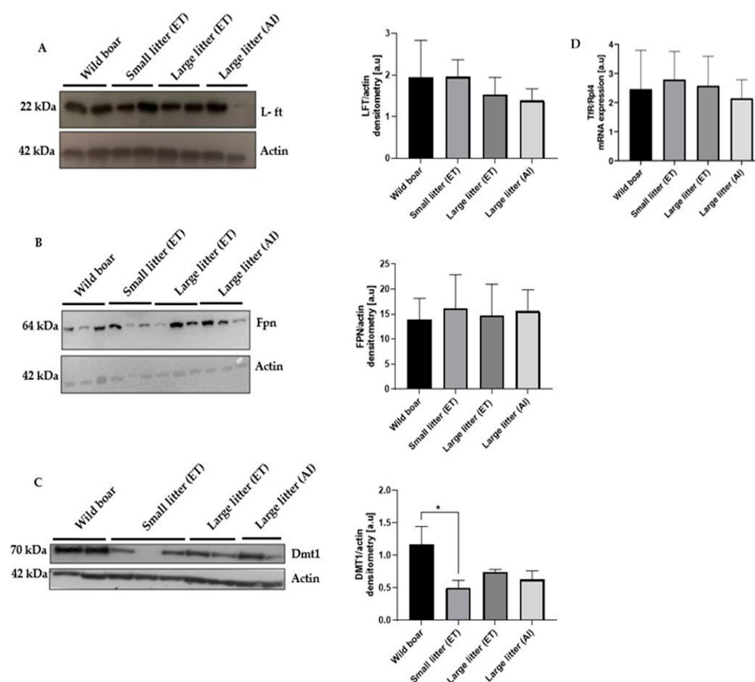


Figure 1. Expression of key iron transporters and L-ferritin in the placentas of wild boar and Polish Large White females with different-size litters. (A) Light chain ferritin (L-Ft), (B) ferroportin (Fpn), and (C) divalent metal transporter 1 (DMT1) in placenta protein extracts were assessed by Western blot analysis. The blots were also re-probed with monoclonal anti- β -actin antibody from mouse as a loading control. Right-hand panels, the intensity of L-Ft, Fpn, and DMT1 bands was quantified with a molecular Imager using Quantity One 4.6 software (Bio-Rad, Hercules, California USA) and is plotted in arbitrary units (a.u.) to present protein levels (means $\pm$ S.D.). (D) Transferrin receptor 1 (TfR1) mRNA level in the placenta measured by real-time quantitative PCR using specific primer pairs (as shown in Table S2). The ribosomal protein L4 (Rpl4) amplicon was used as a control for the amount of cDNA used in the PCR reactions. Each column represents the means $\pm$ S.D. of two amplification reactions, performed using a single cDNA sample reverse-transcribed from RNA prepared from 4–6 females. Significant differences are indicated (* $p < 0.05$).

Although the RNA-seq analysis did not reveal significant differences in the placental expression of most iron transporters and ferritin, protein levels of DMT1 were higher in wild boars compared to that in PLW females with small litters, while no significant differences were found in L-ferritin, ferroportin, or transferrin receptor 1 expression.

2.3. Increased Expression of Multicopper Ferroxidases in Wild Boars Compared to That in PLW Placenta

Interestingly, our RNA-seq data implied that genes encoding for multicopper ferroxidases, such as ceruloplasmin (Cp), hephaestin (Heph), and zyklopen (Zp), that are essential for iron efflux from tissues [20,21] are highly upregulated in wild boar placentas compared to those in placentas from PLW females, regardless of their litter size. The respective

log2FoldChange and corresponding adjusted p -value (padj) for all comparison axes of three examined genes are shown in Table 2. In parallel, we did not detect any differences in the placental expression of *Heph11* (encoding for Zp), *Cp*, and *Heph* genes among PLW gilts having litters of different sizes. To validate the results of RNA-seq analysis, we analyzed *Zp*, *Cp*, and *Heph* mRNA levels by RT-qPCR. Our results largely confirmed the RNA-seq data and revealed a markedly increased expression of all three genes in the wild boar placentas compared to those of PLW gilts with different-size litters (Figure 2A–C). The only not statistically significant difference was found in the *Cp* mRNA levels between wild boar and PLW gilts having large litters after ET (Figure 2A). Interestingly, no differences were detected in the expression of ferroxidase genes between PLW gilts from all experimental groups. These results clearly show that high expression of multicopper ferroxidases at the mRNA level in the wild boar placenta is not preserved in PLW females, and in the latter, it does not depend on the number of piglets in the litter.

Table 2. Changes in the expression of ferroxidase genes in the placenta of wild boar and PLW females.

Comparison between Experimental Groups	Gene Names								
	Hephaestin (<i>Heph</i>)			Ceruloplasmin (<i>Cp</i>)			Hephaestin like 1 (<i>Heph11</i>)		
	Log2-Fold Change	p	padj	Log2-Fold Change	p	padj	Log2-Fold Change	p	padj
Large litter (AI) vs. wild boar	−0.52	0.17	0.72	−0.98	0.22	0.78	−1.48	0.23	0.78
Large litter (ET) vs. wild boar	−0.73	0.05	0.33	−0.32	0.69	0.90	−3.40	0.01	0.11
Small litter (ET) vs. wild boar	−0.34	0.40	0.74	−0.99	0.25	0.64	−3.80	0.00	0.13
Large litter (ET) vs. small litter (ET)	−0.39	0.33	1.00	0.67	0.44	1.00	0.40	0.76	1.00
Large litter (AI) vs. small litter (ET)	−0.18	0.65	1.00	0.00	1.00	1.00	2.32	0.08	0.89
Large litter (AI) vs. large litter (ET)	0.21	0.58	1.00	−0.66	0.41	1.00	1.91	0.12	1.00

ET—embryo transfer, AI—artificial insemination, p — p -value, padj—adjusted p -value.

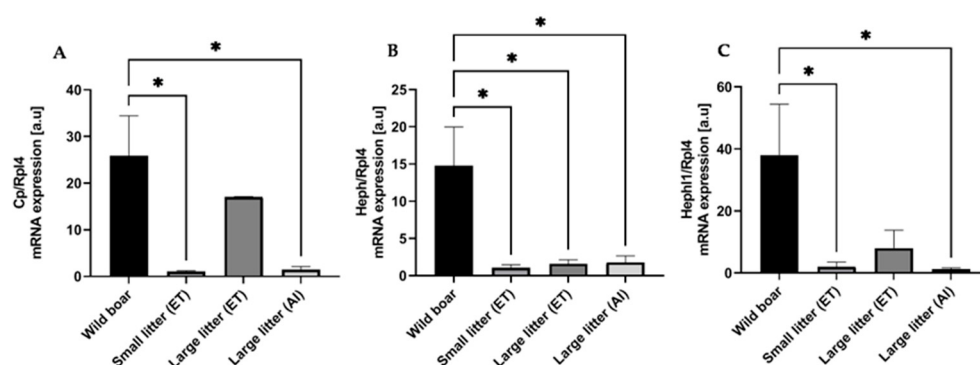


Figure 2. Increased expression of (A) ceruloplasmin (Cp), (B) hephaestin (Heph), and (C) hephaestin like 1 (Heph11) mRNA in the placenta of wild boars compared to that in Polish Large White females with different-size litters. Transcript abundance in placentas was measured by real-time quantitative PCR using specific primer pairs (as shown in Table S2). The ribosomal protein L4 (Rpl4) amplicon was used as a control for the amount of cDNA used in the PCR reactions. Each column represents the means $\pm$ S.D. of two amplification reactions, performed using a single cDNA sample reverse-transcribed from RNA prepared from 4–6 females. Significant differences are indicated (* p < 0.05).

Our RNA-seq and RT-qPCR analyses demonstrated that multicopper ferroxidases, such as ceruloplasmin, hephaestin, and zyklopen, were significantly upregulated in the placentas of wild boars compared to those in PLW females, regardless of litter size. In contrast, no differences were observed in the expression of these ferroxidase genes among PLW females with varying litter sizes, indicating that high expression levels in wild boar placentas are not retained in domestic pigs and do not depend on litter size in the latter.

2.4. Placental Copper Content and Expression of Copper-Related Genes in Wild Boar Sows and PLW Gilts with Different-Size Litters

Fluctuations in copper content may influence the expression and function of multicopper ferroxidases [24]. Having demonstrated their higher expressions in the wild boar placenta, we decided to measure and compare the placental copper level between all experimental groups, assuming that elevated copper levels in the wild boar placenta may be a causative factor of the increased expression of examined ferroxidases. However, we found that the copper content in placentas from wild boar and PLW gilts regardless of litter size was similar, without any significant differences (Figure 3A). Then, we checked whether the phenomenon of increased multicopper ferroxidases expression in the wild boar placenta extended to other enzymes containing copper in their functional redox centers. We analyzed the expression of superoxide dismutase 1 (*Sod1*), an antioxidant enzyme [25], and two P-type ATPases, *Atp7a* and *Atp7b*, which play crucial but distinct roles in copper metabolism [26]. We did not find any differences neither in *Sod1* nor in *Atp7a* mRNA abundance between the experimental groups (Figures 3D and 3C, respectively). Interestingly, the expression of the *Atp7b* gene was several-fold higher in the placenta of wild boars compared to that in the placenta of PLW females having small litters after ET, large litters after AI, and only approximately three times higher (not statistically significant difference) compared to that in gilts having large litters after ET (Figure 3B). Considering that *Atp7b*-mediated incorporation of copper into apo-Cp results in the formation of the stable redox-active holoenzyme [27], an orchestrated increase in the expression of *Cp* and *Atp7b* genes points to Cp as the main ferroxidase acting in the wild boar placenta.

Despite higher expressions of multicopper ferroxidases in wild boar placentas, copper content and the expression of other copper-containing enzymes, such as *Sod1* and *Atp7a*, did not differ significantly between wild boar sows and domestic PLW gilts. Notably, *Atp7b* expression was significantly higher in wild boar placentas.

2.5. Immunofluorescent Localization of Multicopper Ferroxidases and Their Co-Localization with Ferroportin (*Fpn*) in the Maternal Part of the Placenta of Wild Boar and PLW Females

To assess the potential involvement of multicopper ferroxidases in transplacental iron transport, we examined their localization in the maternal part of the placentas from wild boar and PLW females. Considering that in mammalian cells the main pathway for cellular iron egress relies on the cooperation of multicopper ferroxidases with ferroportin (*Fpn*), the only known iron exporter [23], we performed double immunolocalizations of Cp, Zp, and Heph with *Fpn*. First, in wild boar and PLW females, we observed a marked staining of Cp in the maternal part of the placenta, specifically in the apical membrane of luminal epithelial cells of the endometrium (Figure 4A–D). A particularly strong Cp immunopositive signal was detected in the placenta of wild boar females (Figure 4A). Co-localization analysis revealed a tight overlap in the staining of Cp and *Fpn* (Figure 4E–H) suggesting that the Cp–*Fpn* system promoting iron release from cells is functional in both wild boar and PLW placentas. To provide further evidence of the presence of Cp in placentas from all experimental groups, we assessed Cp levels by Western blotting, showing a clear tendency to a higher level in the placenta of wild boars compared to that in PLW females (Figure 4I). Zp, considered the main placental ferroxidase [28], was found similarly to Cp, in the apical membrane of luminal epithelial cells of the maternal part of wild boar and PLW placentas (Figure 5A–D), and showed tight co-localization with *Fpn* (Figure 5E–H). An immunopositive Zp signal was similar in the placentas from all examined groups. Surprisingly, in both wild boar and PLW groups, we also detected the

presence of Zp protein expression in the nuclei of the luminal epithelial cells exclusively in the basal part of the placental villi (Figure 5D, white star and Figure 5I). The nuclear localization of Zp was attested by double immunolocalization with DAPI, a specific marker for DNA (Figure 5I). Finally, using the immunofluorescence method, we analyzed the placental localization of Heph, a trans-membrane protein, which plays a critical role in iron absorption by duodenal enterocytes [29], although its expression has also been found in the mouse placenta [14]. Heph-positive staining (showing similar signal intensity in wild boars and in PLW placentas) was observed in some but not all luminal epithelial cells of the maternal part of the placenta. In contrast to Cp and Zp, the expression of Heph was mainly found in the basal membrane of the luminal epithelial cells (Figure 6A). Only in the wild boar placenta, a few cells revealed the co-localization of Heph and Fpn in the apical membrane (Figure 6E). This Heph–Fpn co-localization was not found in any PLW group (Figure 6F–H).

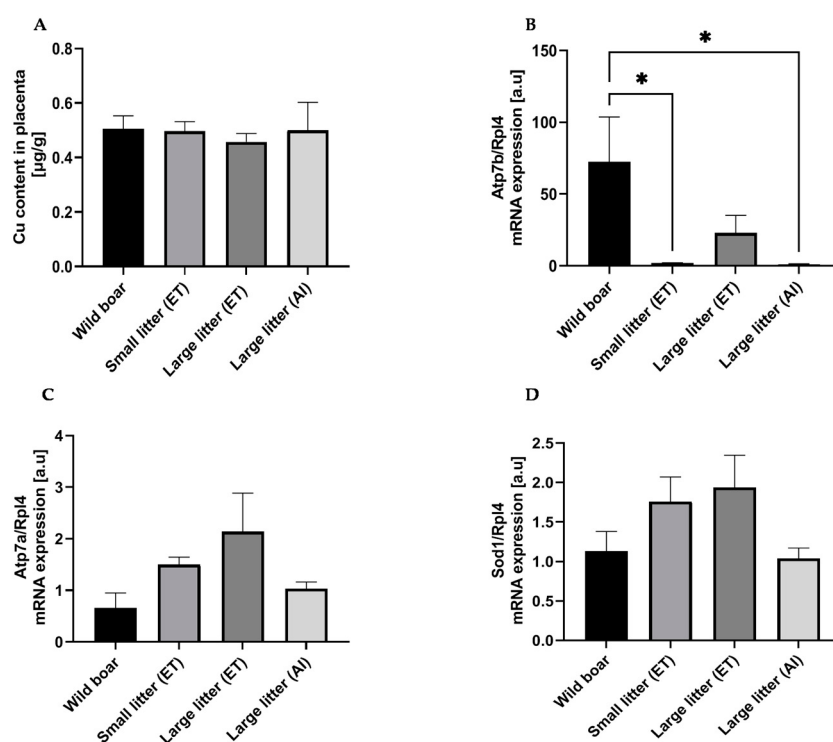


Figure 3. Placental copper content and expression of copper-related genes in wild boar sows and Polish Large White gilts with different-size litters. **(A)** Total copper content in the placenta measured by atomic absorption spectroscopy as described in the Materials and Methods. The values are expressed as the mean $\pm$ S.D. and were obtained from 5 or 6 females. **(B)** Atp7b, **(C)** Atp7a, and **(D)** superoxide dismutase 1 (Sod1) mRNA levels in the placenta. Transcript abundance in the placentas was measured by real-time quantitative PCR using specific primer pairs (as shown in Table S2). The ribosomal protein L4 (Rpl4) amplicon was used as a control for the amount of cDNA used in the PCR reactions. Each column represents the means $\pm$ S.D. of two amplification reactions, performed using a single cDNA sample reverse-transcribed from RNA prepared from 4–6 females. Significant differences are indicated (* $p < 0.05$).

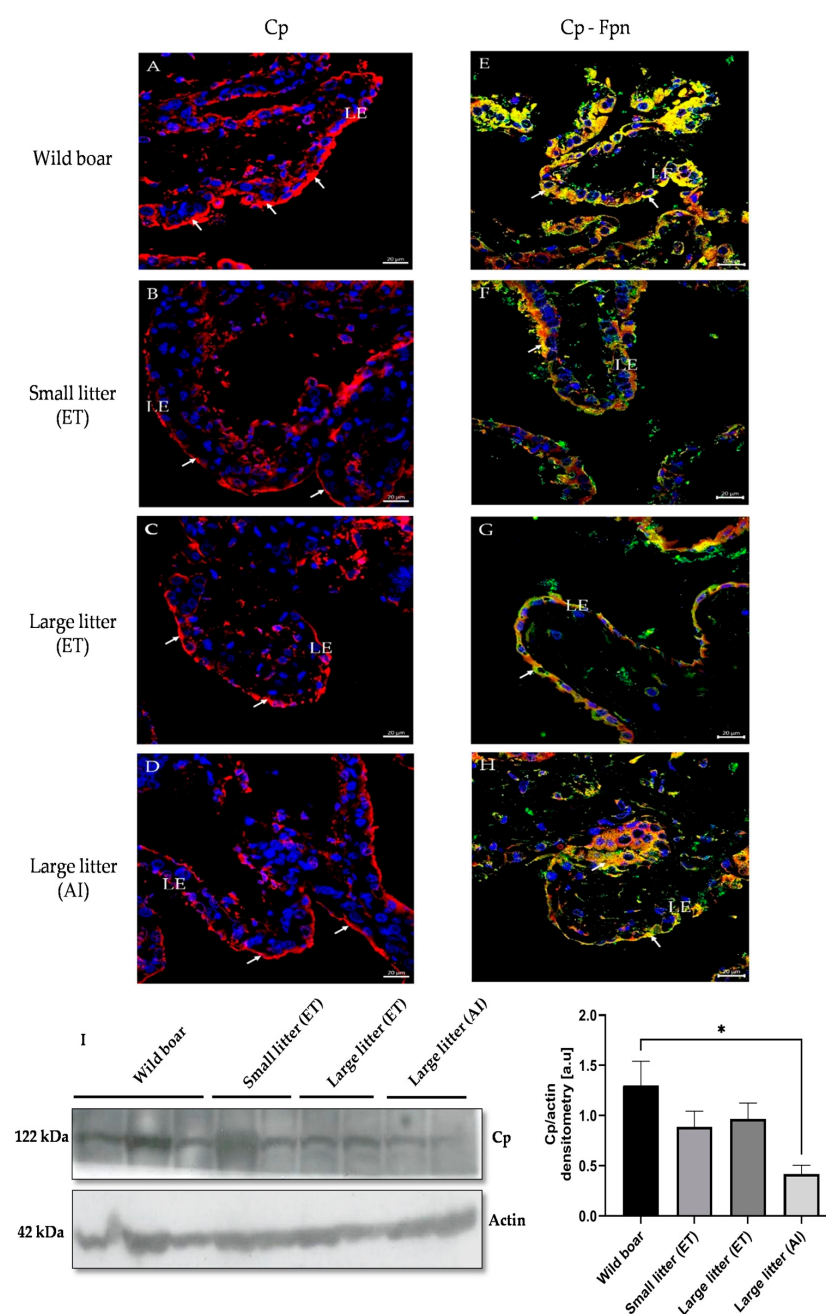


Figure 4. Immunofluorescent localization of ceruloplasmin (Cp) in the maternal part of the placenta of (A) wild boar females and Polish Large White gilts having: (B) small litters obtained by embryo transfer (ET), (C) large litters obtained by ET, and (D) large litters obtained by artificial insemination (AI). (E–H) Respective co-localization of Cp with ferroportin (Fpn). In the left-hand panels, the expression of Cp detected by confocal microscopy was found as a positive immunofluorescent signal (red channel) in the apical membrane of the luminal epithelial (LE) cells of the endometrium (white arrows). In the right-hand panels, the co-localization of Cp (red channel) and Fpn (green channel) is shown in the merged image. Cp–Fpn complexes were visible in the apical membrane of LE (white arrows). The location of the nuclei is disclosed by counterstaining with DAPI (blue channel). Scale bars correspond to 20 μ m. (I) Cp protein levels in placenta membrane extracts were assessed by Western blot analysis. The blots were also incubated with a monoclonal anti- β -actin antibody from mouse as a loading control. In the right-hand panel, the intensity of Cp bands was quantified with a molecular Imager using Quantity One 4.6 software (Bio-Rad) and is plotted in arbitrary units (a.u.) to present protein levels (means $\pm$ S.D.). Significant differences are indicated (* $p < 0.05$).

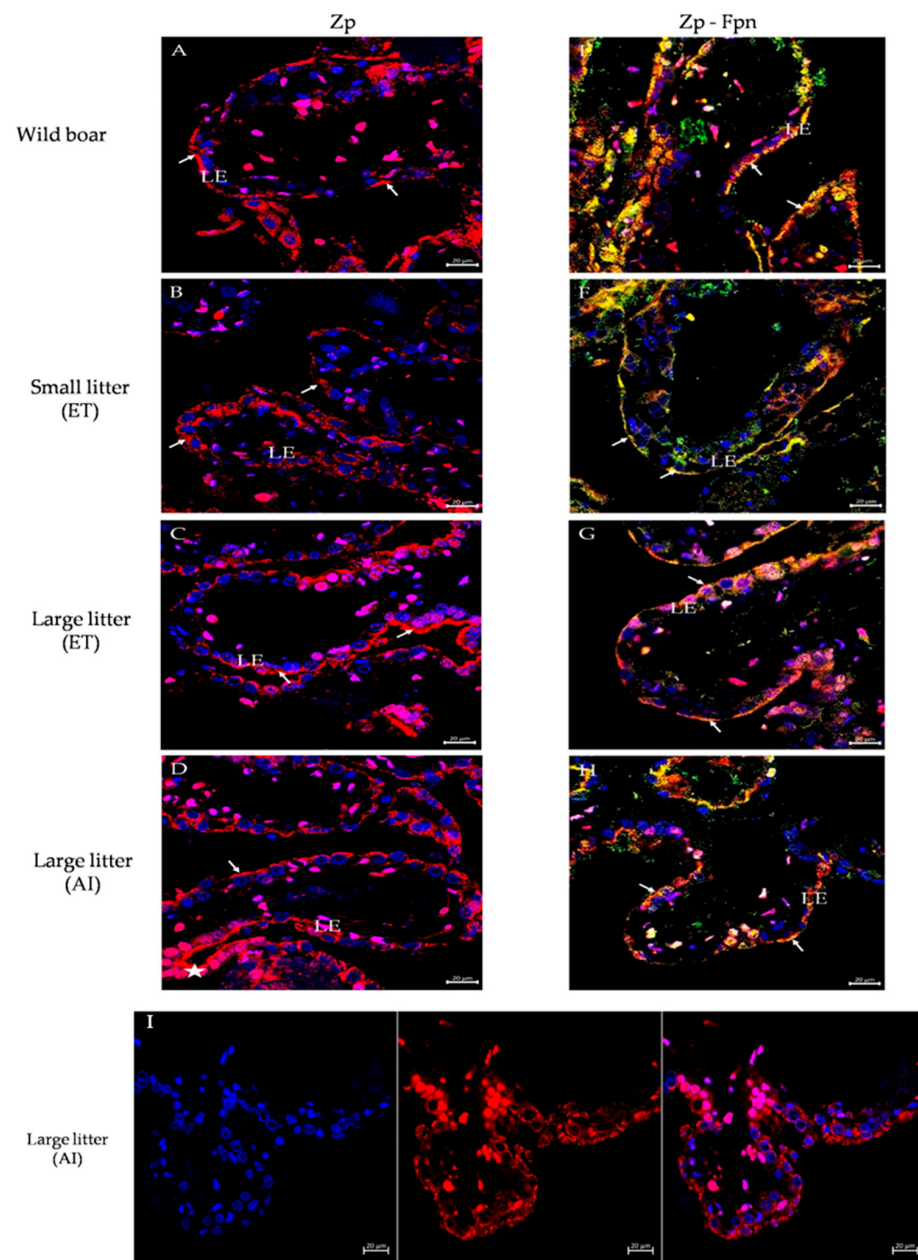


Figure 5. Immunofluorescent localization of zyklopen (Zp) in the maternal part of the placenta of (A) wild boar females and Polish Large White gilts having: (B) small litters obtained by embryo transfer (ET), (C) large litters obtained by ET, and (D) large litters obtained by artificial insemination (AI). (E–H) Respective co-localization of Zp with ferroportin (Fpn). In the left-hand panels, the expression of Zp detected by confocal microscopy was found as a positive immunofluorescent signal (red channel) in the apical membrane of the luminal epithelial (LE) cells of the endometrium (white arrows). In the right-hand panels, the co-localization of Zp (red channel) and Fpn (green channel) is shown in the merged image. Zp–Fpn complexes were visible in the apical membrane of LE (white arrows). Additionally, we found nuclear Zp protein localization (white star) within LE cells (D). This observation is detailed in (I): in the left-hand panel, the location of the nuclei is disclosed by counterstaining with DAPI (blue channel); in the middle panel, there is a Zp-positive immunofluorescent signal (red channel) in the luminal epithelial cells (LE) in the basal part of the placental villi; and in the right-hand panel, the location of Zp (red channel) in the nuclei (DAPI, blue channel) of these cells is shown in the merged image. The presence of Zp in the nuclei is visualized on placenta sections from PLW gilts having large litters after AI; however, it is representative of placentas from all experimental groups. Scale bars correspond to 20 μ m.

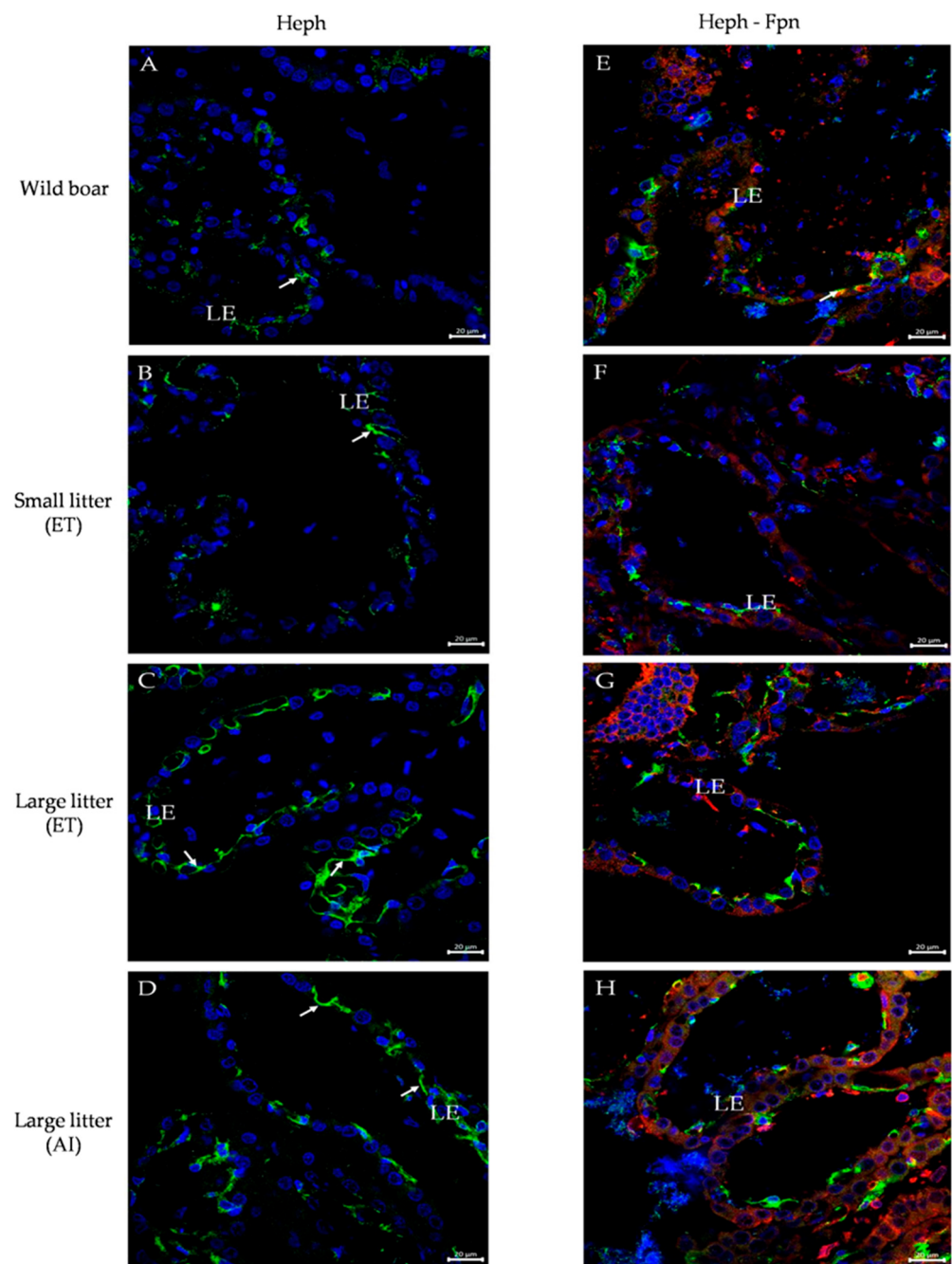


Figure 6. Immunofluorescent (IF) localization of hephaestin (Heph) in the maternal part of the placenta of (A) wild boar females and Polish Large White gilts having: (B) small litters obtained by embryo transfer (ET), (C) large litters obtained by ET, and (D) large litters obtained by artificial insemination (AI). (E–H) Respective co-localization of Heph with ferroportin (Fpn). In the left-hand panel, the expression of Heph detected by confocal microscopy was found as a positive immunofluorescent signal (green channel) in the basal membrane of the luminal epithelial (LE) cells of the endometrium (white arrows). In the right-hand panels, the co-localization of Heph (green channel) and Fpn (red channel) was only found in a few LE cells (white arrow) in the placentas of wild boars (E). Heph–Fpn co-localization was not identified in placenta sections from all PLW groups (F–H). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue channel). Scale bars correspond to 20 μ m.

Our immunolocalization analyzes demonstrated that Cp and Zp were prominently expressed in the apical membrane of luminal epithelial cells in the maternal part of the placenta in both wild boar and PLW females, with Cp showing particularly strong expres-

sion and co-localizing with Fpn in wild boars. In contrast, while hephaestin (Heph) was detected in both wild boar and PLW placentas, its expression was limited to the basal membrane and showed co-localization with Fpn only in wild boars, suggesting a distinct role for Heph in iron transport between these species.

3. Discussion

The placenta serves as the interface between the mother and fetus, mediating nutrient transport to the latter, including the transport of iron. The unidirectional transfer of iron taken up by the placenta from the maternal to the fetal circulation is the only pathway to satisfy the iron requirements of the fetus and to build up fetal hepatic iron stores, which are thought to be the major source of iron during neonatal development [4]. Critically low fetal/newborn hepatic iron stores are considered a primary cause of neonatal iron deficiency anemia (IDA) in modern breeds of domestic pig (*Sus scrofa domestica*) [1–3]. However, it is largely unknown to what extent insufficient placental iron transfer contributes to this fetal iron paucity. In this context, it is worth noting that attempts to supplement pregnant sows with iron to enhance iron transfer across the placenta, fortify the iron stores in their fetuses, and consequently prevent IDA in newborns have been largely unsuccessful [30]. Moreover, our recent results demonstrated that varying the number of piglets in a litter of domestic pigs (from 4 to 14 animals) does not affect the iron status of one-day-old piglets, with all showing IDA [9]. These results suggested that iron delivery across the pig placenta is set at a relatively low level, which excludes enhanced iron transport and the improvement of iron status of piglets from small litters. Additionally, in the same study, we demonstrated that wild boar piglets (typically from litters of 4–6 animals) show similar iron content in the liver compared to that in domestic pig piglets (regardless of litter size) but do not show any symptoms of IDA [9]. These observations prompted us to compare the expression of genes involved in iron trafficking across the placenta between wild boar and domestic pig gilts with different litter sizes. For this purpose, we used placentas from wild boar and PLW gilts with small and large litters, obtained through regulated embryo transfer (ET) or artificial insemination (AI), as recently described [9].

The molecular basis of iron flow through the placenta in pigs is very poorly understood. Reports from the 1980s proposed that uteroferrin, an iron-binding glycoprotein possessing acid phosphatase activity, synthesized and secreted by the maternal uterus, is involved in iron transport to the fetus [31,32]. However, it was later shown that direct transfer of iron to apotransferrin is unlikely to be a physiological role of uteroferrin [33]. Recently, a role of placental hepcidin and ferroportin in local placental iron transfer regulation for improving the iron reserve of piglets has been suggested [22].

To identify iron-related genes that are differentially expressed in the examined placentas, we performed RNA sequencing (RNA-seq) of placenta samples collected from wild boar sows and PLW gilts. RNA-seq data revealed no differences in the transcriptional pattern of iron-related transcripts between placentas of PLW gilts having different-size litters, strongly suggesting that the number of piglets in the litter of PLW gilts has no impact on placental iron metabolism, including iron transfer through the placenta. Similarly, among all genes differentially expressed in wild boar and PLW placentas (from 82 to 164 genes depending on the particular PLW litter size), we did not identify any genes encoding iron transporters or genes regulating placental iron transfer. To ensure that the expression of major genes of the iron transport machinery in the wild boar and domestic pig placenta is consistent, we next assessed their expression at the mRNA or protein levels, using real-time quantitative PCR or Western blot analysis, respectively. We found no differences in either TfR1 mRNA or L-Ft and Fpn protein levels. These results imply that both TfR1-mediated iron uptake and Fpn-mediated iron release are likely functioning at consistent levels across the conditions studied. Similarly, stable L-Ft protein levels indicate an equivalent iron status of all the analyzed placentas. Consequently, any alterations in iron homeostasis in this system may not be due to changes in the expression levels of these key iron transport proteins but rather might be regulated by other factors or mecha-

nisms. Considering that DMT1 is likely involved in endosomal iron transport in placental cells [10,34], it is tempting to propose that the higher DMT1 protein level reported in the wild boar placenta may increase iron flow from the circulation of wild boars compared to that in PLW mothers. However, it should be remembered that within the endosome, DMT1 binds iron delivered by TfR1 [35], and as stated above, the ability of TfR1-mediated iron supply to the placenta was similar in females from all experimental groups. One of the most important findings of our study, attested first by RNA-seq and validated by real-time quantitative PCR, was the demonstration of the presence of highly expressed genes encoding multicopper ferroxidases such as ceruloplasmin (Cp), hephaestin (Heph), and zyklopen (Zp) [20,21] in wild boars compared to that in PLW placentas. These enzymes are Fe(II) oxidoreductases, whose structure is characterized by the presence of copper centers and a high-affinity ferrous iron binding site [20,21]. Importantly, all three ferroxidases have been reported to assist ferroportin in cellular iron efflux and its subsequent incorporation into transferrin for systemic distribution [17,36]. Multicopper ferroxidases are expressed in multiple tissues, but in individual tissues, each of them plays a specific role. Cp can be expressed as a secreted protein or as a membrane glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (GPI-Cp) [37]. GPI-Cp is particularly required for iron efflux from cells in the central nervous system [36] and for efficient recycling of iron by macrophages, a process indispensable for systemic iron turnover [38]. Heph is a protein critical for intestinal iron absorption, highly expressed throughout the small intestine [29,39]. Zp has been identified as a placenta-specific ferroxidase, abundantly expressed in this tissue [28], although further research showed that it is not essential for the efficient transfer of iron to the fetus in mice [40]. To determine whether the increased expression of copper-related genes in the wild boar placenta is limited to multicopper ferroxidases, we examined the placental expression of other copper enzymes or copper-transporting proteins such as superoxide dismutase 1 (Sod1) [41] and P-type ATPases (Atp7a and Atp7b) [26]. Considering that copper is a potential factor regulating the expression of multicopper ferroxidases [27], we measured the content of this microelement in placentas but did not find any differences between the experimental groups. Interestingly, we observed an increased level of Atp7b transcript in wild boar placenta. This finding is related to the elevated Cp mRNA level in this placenta, as Atp7b ATPase is necessary for the metallation of apo-Cp, resulting in the formation of the redox-active enzyme holo-Cp [42]. In the next step of multicopper ferroxidase analysis in wild boar and PLW placentas, we used the immunofluorescence (IF) method and confocal microscopy to determine their localization and potential overlap in staining with ferroportin. We showed that both Cp and Zp are expressed in the maternal part of the placenta from all experimental groups, more precisely in the apical membrane of luminal epithelial cells of the endometrium, and they tightly co-localize with Fpn. Although Heph was also identified in several luminal epithelial cells of the endometrium, in contrast to Cp and Zp, it showed mainly basal localization with barely detectable (in wild boar females) or no co-localization (in PLW females) with Fpn. To our knowledge, the expression of multicopper ferroxidases in the placenta of *Sus* species has not been studied so far, and here we provide the first description of their expression and placental localization in wild boar and domestic pig. It should be noted that our understanding of pathways of iron transfer across the placenta is mostly based on human and rodent studies [4]. The mouse/human placenta is a hemochorial placenta, which means that maternal blood comes in direct contact with fetal trophoblasts [10]. Meanwhile, the pig placenta is classified as diffuse, mutually folded, non-invasive, and epitheliochorial, where there is no invasion of fetal tissue into the maternal endometrium [43]. From the maternal site, it is composed of the following layers: maternal endothelial vessels, endometrial connective tissue, endometrial luminal epithelium, trophoblast epithelium, chorionic connective tissue, and fetal endothelial vessels. The trophoctoderm directly attaches to the endometria luminal epithelium, creating a bilayer at the maternal–fetal interface [43]. Nevertheless, despite anatomical differences in placenta structure between mammalian species, it seems that the functions of key proteins involved in iron transport through the placenta are similar.

Although Cp and Heph have been identified in human [44] and mouse [45] placentas, there is evidence that these ferroxidases are not necessary for placental iron transport [20,46]. Our results showing extensive immunostaining of Cp in the apical membrane of luminal epithelial cells of the endometrium (especially in wild boar) and its tight co-localization with Fpn strongly suggest that Cp may facilitate iron egress from the maternal part of the placenta in the examined *Sus* species. In contrast, neither the intensity of Heph IF signals nor the distribution of Heph in the maternal part of the placenta indicate its active role in transplacental iron transport. Finally, IF analysis of Zp in wild boar and PLW placentas clearly shows that similarly to rodents [28], this ferroxidase may also be involved in placental iron metabolism in wild boar and domestic pig. Interestingly, besides finding Zp in the apical membrane of luminal epithelial cells of the endometrium (localization typical for its role in iron transport), we identified for the first time Zp protein expression in the nuclei of the luminal epithelial cells, exclusively in the basal part of the placental villi in both wild boar and PLW females. This particular localization of Zp may be associated with its role in cell proliferation as suggested previously [47].

In summary, our study emphasizes the lack of differences in the molecular potential to transfer iron across the placenta between domestic pig gilts having different-size litters. Furthermore, our results indicate that strong selection for a greater number of piglets in the litter does not result in simultaneous changes in placental iron metabolism. In gilts with large litters, the molecular iron transport machinery in the placenta is not adapted to satisfy the iron demand imposed by a greater number of fetuses. Furthermore, in PLW gilts, the ability for placental iron trafficking is reminiscent of that established in wild boars, the ancestors of domesticated pigs, which typically have less than half as many piglets per litter compared to domestic pigs. Importantly, our study provides evidence for the first time that all three multicopper ferroxidases are expressed in the maternal part of wild boar and PLW placentas, and two of them, namely Cp and Zp, seem to cooperate with Fpn in transporting iron to fetuses.

4. Materials and Methods

4.1. Animal Experimentation

The use of animals in the experiment and all procedures were approved by the Local Ethical Committee on Animal Testing at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences (experiment on wild boar; permission number: 081/2020/P1) and the Second Local Ethical Committee on Animal Testing in Kraków (experiment on PLW pigs; permission no. 399/2020).

4.2. Polish Large White Pig

The experiment with PLW pigs was conducted at the Pig Experimental Station in Żerniki Wielkie, belonging to the National Research Institute of Animal Production (Balice, Poland). The gilts were housed under standard conditions (70% humidity, temperature 22 °C) in gestation cages (2.2 × 0.65 × 1.8 m) with straw bedding. The gilts were placed in farrowing cages (2.4 × 3.4 m) on day 110 of gestation. Until parturition, the females were offered standard fodder for pregnant gilts containing 120 mg Fe/kg, as estimated by flame spectrometry. In this study, “large litter” refers to litters of 14 ± 2 piglets, contrasting with “small litters” of 4 ± 2 piglets. Although litters of 18–20 piglets are considered large in contemporary pig production [48,49], achieving such litter size through embryo transfer (ET) is challenging, especially in PLW pigs. Embryos were collected from fifteen 6-month-old PLW gilts (weighing 90–110 kg), superovulated with 1500 I.U. PMSG and 1000 I.U. hCG, then inseminated on the oestrus day with standard semen doses. The embryos were retrieved 72–74 h after hCG injection by flushing each oviduct with 20 mL of PBS with BSA at 38 °C. The embryos were then screened and evaluated morphologically. Recipient gilts (6-month-old PLW, ~90 kg) were synchronized with 750 I.U. PMSG and 500 I.U. hCG, followed by surgical ET on the second day after synchronized heat. Embryos (6–8 or 14–16 per recipient) were introduced into the fallopian tubes. Pregnancy success was confirmed

by ultrasound, with large litters (10 ± 1 piglets) obtained from five gilts and small litters (4 ± 2 piglets) from seven gilts. Control large litters (14 ± 2 piglets) were obtained via routine artificial insemination (AI) from six 1-year-old sows. The control was used to assess the impact of the ET procedure on the outcomes of the studied parameters. This approach enabled a more accurate assessment of whether any differences in these parameters were due to the litter size rather than the technique used to produce the litters. The procedure has been described in detail [9].

4.3. Wild Boars

The experiment with wild boars was conducted at the Centre for Research into Forests and Game Breeding of Wrocław University of Environmental and Life Sciences (Złotów, Poland). Clinically healthy wild boar females captured in the forest of Trzebnica and Oleśnica County, Lower Silesian Voivodeship, were kept in semi-wild conditions on a forest farm monitored by 12 cameras that were used to track their behavior, particularly rutting, mating, and preparations for farrowing. The farm was divided into three enclosures of approximately 1300 m² each. Two sows were placed in each enclosure, and a male boar was introduced for the mating period (November to January). The animals had *ad libitum* access to water and were fed maize grain, potatoes, and fresh forage daily. The ground allowed for burrowing and other natural wild boar behaviors such as mud baths and scratching against tree trunks. For the experiment, we used six 1–2-year-old sows weighing 60–80 kg and having 4 ± 2 piglets in the litters [9].

4.4. Collection of Tissue Samples

Placental samples were collected from the maternal–chorioallantoic interface at each horn, immediately after its expulsion, then washed with PBS and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to RT-qPCR and Western blot analysis. Placenta samples for immunofluorescence analysis were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS.

4.5. Next-Generation Sequencing

Total cellular RNA was extracted from tissues (20 mg) using an SV Total Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. RNA quality was controlled by a fluorescence-based quantification method and fragment-length analysis. After initial quality control, the needed samples were DNase-treated to remove residual DNA detected in them. Afterwards, all samples passed quality control and were further processed. The library preparation was carried out using a SMART-Seq Stranded kit from Takara Bio, (Kusatsu, Shiga, Japan). The total quantity used was 10.00 ng. RNA sequencing of 5 individuals per group was performed by CeGaT (Tübingen, Germany) using an Illumina NovaSeq 6000, $2 \times 101\text{ bp}^*$. Q30 value of sequencing (RNA): $\geq 87.83\%$. Demultiplexing of the sequencing reads was performed using Illumina bcl2fastq (2.20). Adapters were trimmed with Skewer (version 0.2.2) [50]. Quality trimming of the reads was not performed. For samples prepared with the Takara kit (Kusatsu, Shiga, Japan) (SMART-Seq Stranded), the first three nucleotides of the second sequencing read (Read 2) were derived from the Pico v2 SMART adapter. Those three nucleotides were trimmed with Skewer (version 0.2.2) [50]. Trimmed raw reads were aligned to Sscrofa11.1 using STAR (version 2.7.3) [51]. Differential expression analysis between groups was performed with DESeq2 (version 1.24.0) [52] in R (version 4.0.4) (R Core Team 2015). Differential expression analysis between groups was performed with DESeq2 (version 1.24.0) [52] in R (version 4.0.4) (R Core Team 2015). DESeq2 uses a negative binomial generalized linear model to test for differential expression based on gene counts. Using normalized counts, DESeq2 calculates the log₂ fold change, where the *p*-value reports the statistical significance of this result (Wald test). To identify genes with a significant difference in expression, a threshold of $\log_2\text{FoldChange} \geq 0.5$ was applied. This means that genes were considered significantly altered if their expression ratio between groups differed by at least 50% (or its inverse) on a

logarithmic scale. Since we compared thousands of genes, we had to correct for multiple testing. For this, we used the Benjamini–Hochberg correction [53] implemented in DESeq2 to adjust the p -value (padj). Genes with padj < 0.05 were considered statistically significant.

4.6. Real-Time Quantitative PCR

Total cellular RNA was extracted from tissues (20 mg) using an SV Total Isolation System (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Two micrograms of total DNase-treated RNA were reverse-transcribed using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland). Real-time quantitative PCR analysis was performed in a LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using gene-specific primer pairs (Table S1). The amplified products were detected using SYBR Green I (Roche Diagnostics, Switzerland). LightCycler 96 Software (Version 1.1.0.1320, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used for data analysis. Transcript levels were normalized relative to the ribosomal protein L4 (Rpl4). The analysis of RT-qPCR results was based on $-\Delta C_t$ (cycle threshold) (C_t of reference gene— C_t of test gene). The control reference gene was selected using NormFinder software (<https://www.moma.dk/software/normfinder> (accessed on 9 July 2024)). NormFinder identifies the most stable reference genes by assessing expression variance between and within sample groups to ensure precise normalization in gene expression studies.

4.7. Protein Extract Preparation and Western Blotting

For the analysis of proteins, placental tissues were homogenized in a sucrose–histidine buffer (0.25 mol/L sucrose, 0.03 mol/L histidine, pH 7.2) supplemented with protease inhibitors (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). The homogenates were centrifuged at $6000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The supernatant was transferred to new centrifuge tubes and subjected to ultracentrifugation at 36,000 rpm using an Optima XPN-100 ultracentrifuge (Beckman Coulter, Brea, California, USA) for 45 min at 4 °C to separate membrane and cytoplasmic protein fractions. The cytoplasmic protein fraction, obtained from the supernatant, was frozen, while the membrane protein fraction, found in the sediment, was resuspended in the sucrose–histidine buffer. To obtain the total protein fraction, homogenates were centrifuged in a sucrose–histidine buffer at $12,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the pellet was discarded. The resulting suspension was stored at -80 °C. Protein concentrations were determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California USA), and protein extracts were subjected to SDS-PAGE electrophoresis. Transfer efficiency was verified by Ponceau-S staining. A PVDF membrane was blocking with 5% skimmed milk. The details of primary and secondary antibodies used are provided in Table S2. After incubation with the primary antibody overnight at 4 °C, the blots were washed and incubated with secondary antibodies at room temperature for 1 h, followed by visualization using the SuperSignal™ Western Blot Enhancer (Thermo Scientific, USA). Band intensities were quantified by densitometric analysis using Quantity One software, version 4.6.6 (Biorad, Hercules, CA, USA). For our Western blot analysis, β -actin was employed as a loading control to ensure the accuracy and reliability of protein quantification.

4.8. Measurement of Copper Content in Placenta

Copper concentration was determined in the placenta by atomic absorption spectroscopy. Samples were digested in 2 mL of boiling Suprapur-grade nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany). After cooling to RT, each sample was suspended in 10 mL of deionized water. Reference material samples were prepared in a similar manner. The copper concentration was measured using the graphite furnace atomic absorption spectrometry (AAS) technique (AAnalyst 800, PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

4.9. Immunofluorescence (IF) Analysis and Confocal Microscopy of Placental Sections

Placentas were immediately dissected and fixed in 4% paraformaldehyde (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C for 24 h. Following two 30-min washes in PBS, the placentas were successively soaked in 12.5% and 25% sucrose (Bioshop, Burlington, ON, Canada) at 4 °C for 2 h and 7 days, respectively. The placental samples were then embedded in a Cryomatrix medium (Thermo Scientific, USA), frozen in liquid nitrogen, and sectioned in 20 µm slices using a cryomicrotome (Leica, Wetzlar, Germany). The sections were washed in PBS for 10 min and permeabilized by bathing in PBS/0.1% Triton X-100 (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) for 20 min. Non-specific antibody binding was blocked by incubating the tissue sections in PBS/3% BSA (Bioshop, Canada) at room temperature (RT) for 1.5 h. For protein detection, sections were incubated overnight at RT with primary antibodies diluted in PBS/3% BSA. The primary and fluoro-chrome-conjugated secondary antibodies used in IF analysis are described in Table S2. Next, the sections were washed for 5 × 6 min with PBS/0.1% Triton X-100 and incubated for 1.5 h with secondary antibody diluted in PBS/3% BSA at RT. Finally, the sections were washed for 10 min in PBS and mounted in a Vectashield medium with DAPI (Vector Labs, Newark, CA, USA).

The presence of ferroxidases and Fpn in the luminal cells of the endometrium was determined by double immunofluorescence localization of the investigated proteins. In order to distinguish different proteins in this experiment, the secondary antibodies were conjugated with different fluorochromes: Cy3 for Cp and Zp, Alexa488 for Fpn, Alexa488 for Heph, and Cy3 for Fpn. For the immunolocalization of Fpn and ferroxidases, the placenta sections were first incubated with anti-Fpn and then with anti-ferroxidases primary antibodies. Then, the sections were incubated with the mixture of secondary antibodies. The sections were then washed for 5 × 6 min with PBS/0.1% Triton X-100 and for 10 min in PBS and mounted in a Vectashield medium with DAPI (Vector Labs, Newark, CA, USA). IF was analyzed with a Zeiss LSM 710 confocal microscope (CarlZeiss, Oberkochen, Germany) using a ×40 objective and Zeiss ZEN software (version 3.0).

4.10. Statistical Analyses

The results are presented as the means ± SD (standard deviation). Kolmogorov–Smirnov tests were performed to evaluate normality. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical evaluation of the data, and post hoc Tukey’s test was applied ($p < 0.05$).

5. Conclusions

The results of our study challenge the idea that domestic pig females can adapt to meet the increased iron demand imposed by a high number of piglets in a litter by enhancing transplacental iron transfer. Essentially, domestic pig females retain the molecular potential for iron transfer across the placenta, a trait inherited from their ancestor, the wild boar. Although the analysis of major iron transporters did not show significant differences, the higher expression of copper-dependent ferroxidases in wild boar placentas suggests that their presence may influence the efficiency of iron export to the fetal circulation. The extent to which this phenomenon contributes to meeting the iron requirements of larger litters requires further research.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25179638/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, Z.K. and P.L.; formal analysis, Z.K. and A.S.; funding acquisition, P.L.; investigation, Z.K., R.R.S., M.L. and M.G.; methodology, Z.K., M.L., J.O., Z.S., B.G., J.N., M.O., R.M., X.W., W.P., N.P.-N. and S.H.; supervision, P.L.; visualization, Z.K. and A.S.; writing—original draft, Z.K. and P.L.; writing—review and editing, R.R.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant no. 2019/33/B/NZ9/02566 from the National Center of Science to Paweł Lipiński.

Institutional Review Board Statement: The use of animals in the experiment and all procedures were approved by the Local Ethical Committee on Animal Testing at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences (experiment on wild boar; permission number: 081/2020/P1) and the Second Local Ethical Committee on Animal Testing in Kraków (experiment on PLW pigs; permission no. 399/2020). All procedures were conducted according to the guidelines of the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. The use of pigs in the experiment and all procedures were approved by the National Research Institute of Animal Production, the owner of the Experimental Station in Żerniki Wielkie. The use of wild boars in the experiment and all procedures were approved by Wrocław University of Environmental and Life Sciences, the owner of the Centre for Research into Forests and Game Breeding.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper.

Acknowledgments: We thank Andrzej Kuźma and Joanna Abramczyk for the collection of blood, colostrum, and placenta samples from PLW gilts. We also thank Piotr Poznański for technical support in performing the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

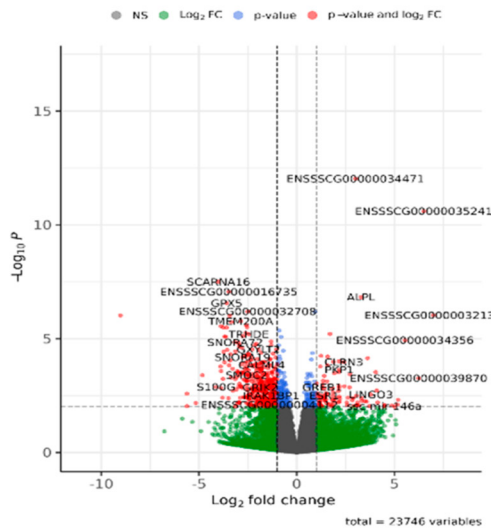
1. Svoboda, M.; Drabek, J. Iron Deficiency in Suckling Piglets: Etiology, Clinical Aspects and Diagnosis. *Folia Vet.* **2005**, *49*, 104–111.
2. Kim, J.C.; Wilcock, P.; Bedford, M. Iron Status of Piglets and Impact of Phytase Superdosing on Iron Physiology: A Review. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2017**, *235*, 8–14. [\[CrossRef\]](#)
3. Szudzik, M.; Starzyński, R.R.; Jończy, A.; Mazgaj, R.; Lenartowicz, M.; Lipiński, P. Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency Anemia. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Fisher, A.L.; Nemeth, E. Iron Homeostasis during Pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106*, 1567S–1574S. [\[CrossRef\]](#)
5. Venn, J.A.J.; Mccance, R.A.; Widdowson, E.M. Iron Metabolism in Piglet Anaemia. *J. Comp. Pathol. Ther.* **1947**, *57*, 314–325. [\[CrossRef\]](#)
6. Blicharski, T.; Polok, P.; Snopkiewicz, M. *Performance Results 2017*; Pigs. Polish Pig Breeders and Producers Association “POLSUS”: Warszawa, Poland, 2017; pp. 17–21.
7. Freking, B.A.; Lents, C.A.; Vallet, J.L. Selection for Uterine Capacity Improves Lifetime Productivity of Sows. *Anim. Reprod. Sci.* **2016**, *167*, 16–21. [\[CrossRef\]](#)
8. Sell-Kubiak, E. Selection for Litter Size and Litter Birthweight in Large White Pigs: Maximum, Mean and Variability of Reproduction Traits. *Animal* **2021**, *15*, 100352. [\[CrossRef\]](#)
9. Kopeć, Z.; Mazgaj, R.; Starzyński, R.R.; Wang, X.; Opiela, J.; Smorag, Z.; Gajda, B.; Nicpoń, J.; Lenartowicz, M.; Ogłuszka, M.; et al. Impact of Litter Size on the Hematological and Iron Status of Gilts, Sows and Newborn Piglets: A Comparative Study of Domestic Pigs and Wild Boars. *BMC Vet. Res.* **2024**, *20*, 64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Sangkhae, V.; Nemeth, E. Placental Iron Transport: The Mechanism and Regulatory Circuits. *Free. Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 254–261. [\[CrossRef\]](#)
11. O'Brien, K.O. Maternal, Fetal and Placental Regulation of Placental Iron Trafficking. *Placenta* **2022**, *125*, 47–53. [\[CrossRef\]](#)
12. Sangkhae, V.; Fisher, A.L.; Wong, S.; Koenig, M.D.; Tussing-Humphreys, L.; Chu, A.; Lelić, M.; Ganz, T.; Nemeth, E. Effects of Maternal Iron Status on Placental and Fetal Iron Homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 625–640. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Mazgaj, R.; Lipiński, P.; Edison, E.S.; Bednarz, A.; Staroń, R.; Haberkiewicz, O.; Lenartowicz, M.; Smuda, E.; Jończy, A.; Starzyński, R.R. Marginally Reduced Maternal Hepatic and Splenic Ferroportin under Severe Nutritional Iron Deficiency in Pregnancy Maintains Systemic Iron Supply. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, 659–670. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Cao, C.; Fleming, M.D. The Placenta: The Forgotten Essential Organ of Iron Transport. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 421–431. [\[CrossRef\]](#)
15. Lipiński, P.; Styś, 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. [\[CrossRef\]](#)
16. Knutson, M.D. Steap Proteins: Implications for Iron and Copper Metabolism. *Nutr. Rev.* **2007**, *65*, 335–340. [\[CrossRef\]](#)
17. Li, Y.-Q.; Bai, B.; Cao, X.-X.; Zhang, Y.-H.; Yan, H.; Zheng, Q.-Q.; Zhuang, G.-H. Divalent Metal Transporter 1 Expression and Regulation in Human Placenta. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *146*, 6–12. [\[CrossRef\]](#)
18. Arosio, P.; Elia, L.; Poli, M. Ferritin, Cellular Iron Storage and Regulation. *IUBMB Life* **2017**, *69*, 414–422. [\[CrossRef\]](#)
19. McKie, A.T.; Barlow, D.J. The SLC40 Basolateral Iron Transporter Family (IREG1/Ferroportin/MTP1). *Pflug. Arch.* **2004**, *447*, 801–806. [\[CrossRef\]](#)

20. Helman, S.L.; Zhou, J.; Fuqua, B.K.; Lu, Y.; Collins, J.F.; Chen, H.; Vulpe, C.D.; Anderson, G.J.; Frazer, D.M. The Biology of Mammalian Multi-Copper Ferroxidases. *Biometals* **2023**, *36*, 263–281. [\[CrossRef\]](#)
21. Vashchenko, G.; MacGillivray, R.T.A. Multi-Copper Oxidases and Human Iron Metabolism. *Nutrients* **2013**, *5*, 2289–2313. [\[CrossRef\]](#)
22. Rajamanickam, K.; Leela, V.; Suganya, G.; Basha, S.H.; Parthiban, M.; Pazhanivel, N.; Mangala Gowri, A. Expression of Iron Regulatory Proteins in Full-Term Swine Placenta. *Reprod. Domest. Anim.* **2020**, *55*, 931–942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Donovan, A.; Lima, C.A.; Pinkus, J.L.; Pinkus, G.S.; Zon, L.I.; Robine, S.; Andrews, N.C. The Iron Exporter Ferroportin/Slc40a1 Is Essential for Iron Homeostasis. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 191–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Prohaska, J.R. Impact of Copper Limitation on Expression and Function of Multicopper Oxidases (Ferroxidases). *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 89–95. [\[CrossRef\]](#)
25. Trist, B.G.; Hilton, J.B.; Hare, D.J.; Crouch, P.J.; Double, K.L. Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 9215–9246. [\[CrossRef\]](#)
26. La Fontaine, S.; Ackland, M.L.; Mercer, J.F.B. Mammalian Copper-Transporting P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B: Emerging Roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 206–209. [\[CrossRef\]](#)
27. Collins, J.F.; Prohaska, J.R.; Knutson, M.D. Metabolic Crossroads of Iron and Copper. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 133–147. [\[CrossRef\]](#)
28. Chen, H.; Attieh, Z.K.; Syed, B.A.; Kuo, Y.; Stevens, V.; Fuqua, B.K.; Andersen, H.S.; Naylor, C.E.; Evans, R.W.; Gambling, L.; et al. Identification of Zyklopen, a New Member of the Vertebrate Multicopper Ferroxidase Family, and Characterization in Rodents and Human Cells123. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 1728–1735. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Fuqua, B.K.; Lu, Y.; Darshan, D.; Frazer, D.M.; Wilkins, S.J.; Wolkow, N.; Bell, A.G.; Hsu, J.; Yu, C.C.; Chen, H.; et al. The Multicopper Ferroxidase Hephaestin Enhances Intestinal Iron Absorption in Mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98792. [\[CrossRef\]](#)
30. Mazgaj, R.; Lipiński, P.; Starzyński, R.R. Iron Supplementation of Pregnant Sows to Prevent Iron Deficiency Anemia in Piglets: A Procedure of Questionable Effectiveness. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 4106. [\[CrossRef\]](#)
31. Roberts, R.M.; Raub, T.J.; Bazer, F.W. Role of Uteroferrin in Transplacental Iron Transport in the Pig. *Fed. Proc.* **1986**, *45*, 2513–2518.
32. Ducsay, C.A.; Buhi, W.C.; Bazer, F.W.; Roberts, R.M.; Combs, G.E. Role of Uteroferrin in Placental Iron Transport: Effect of Maternal Iron Treatment on Fetal Iron and Uteroferrin Content and Neonatal Hemoglobin. Available online: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/59/5/1303/4746784?redirectedFrom=fulltext&login=false> (accessed on 28 August 2024).
33. Doi, K.; Antanaitis, B.C.; Aisen, P. Absence of Iron Transfer from Uteroferrin to Transferrin. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14936–14938. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Chong, W.S.; Kwan, P.C.; Chan, L.Y.; Chiu, P.Y.; Cheung, T.K.; Lau, T.K. Expression of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) Isoforms in First Trimester Human Placenta and Embryonic Tissues. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 3532–3538. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Li, P.; Zhong, Y.; Jiang, X.; Wang, C.; Zuo, Z.; Sha, A. Seminal Plasma Metals Concentration with Respect to Semen Quality. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *148*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
36. Jeong, S.Y.; David, S. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Ceruloplasmin Is Required for Iron Efflux from Cells in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27144–27148. [\[CrossRef\]](#)
37. Hellman, N.E.; Gitlin, J.D. Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 439–458. [\[CrossRef\]](#)
38. Knutson, M.; Wessling-Resnick, M. Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *38*, 61–88. [\[CrossRef\]](#)
39. 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. [\[CrossRef\]](#)
40. Helman, S.L.; Wilkins, S.J.; McKeating, D.R.; Perkins, A.V.; Whibley, P.E.; Cuffe, J.S.M.; Simmons, D.G.; Fuqua, B.K.; Vulpe, C.D.; Wallace, D.F.; et al. The Placental Ferroxidase Zyklopen Is Not Essential for Iron Transport to the Fetus in Mice. *J. Nutr.* **2021**, *151*, 2541–2550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055. [\[CrossRef\]](#)
42. Bartee, M.Y.; Lutsenko, S. Hepatic Copper-Transporting ATPase ATP7B: Function and Inactivation at the Molecular and Cellular Level. *Biometals* **2007**, *20*, 627–637. [\[CrossRef\]](#)
43. Almeida, F.R.C.L.; Dias, A.L.N.A. Pregnancy in Pigs: The Journey of an Early Life. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2022**, *78*, 106656. [\[CrossRef\]](#)
44. Guller, S.; Buhimschi, C.S.; Ma, Y.Y.; Huang, S.T.J.; Yang, L.; Kuczynski, E.; Zambrano, E.; Lockwood, C.J.; Buhimschi, I.A. Placental Expression of Ceruloplasmin in Pregnancies Complicated by Severe Preeclampsia. *Lab. Invest.* **2008**, *88*, 1057–1067. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Harris, Z.L.; Durley, A.P.; Man, T.K.; Gitlin, J.D. Targeted Gene Disruption Reveals an Essential Role for Ceruloplasmin in Cellular Iron Efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10812–10817. [\[CrossRef\]](#)
46. Fuqua, B.K.; Lu, Y.; Frazer, D.M.; Darshan, D.; Wilkins, S.J.; Dunn, L.; Loguinov, A.V.; Kogan, S.C.; Matak, P.; Chen, H.; et al. Severe Iron Metabolism Defects in Mice with Double Knockout of the Multicopper Ferroxidases Hephaestin and Ceruloplasmin. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *6*, 405–427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Planque, N. Nuclear Trafficking of Secreted Factors and Cell-Surface Receptors: New Pathways to Regulate Cell Proliferation and Differentiation, and Involvement in Cancers. *Cell Commun. Signal.* **2006**, *4*, 7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

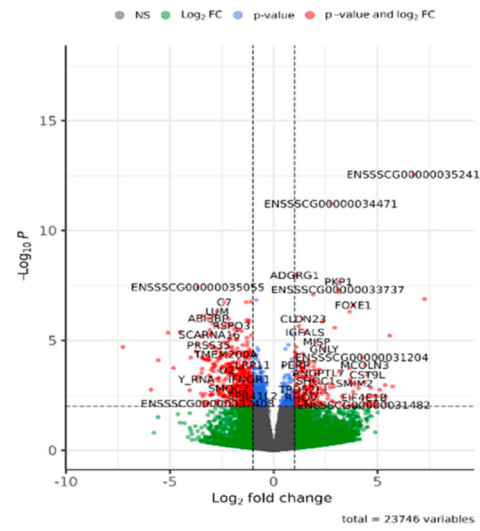
48. Nowak, B.; Mucha, A.; Moska, M.; Kruszyński, W. Reproduction Indicators Related to Litter Size and Reproduction Cycle Length Among Sows of Breeds Considered Maternal and Paternal Components Kept on Medium-Size Farms. *Animals* **2020**, *10*, 1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Oliviero, C. Offspring of Hyper Prolific Sows: Immunity, Birthweight, and Heterogeneous Litters. *Mol. Reprod. Dev.* **2023**, *90*, 580–584. [[CrossRef](#)]
50. Jiang, H.; Lei, R.; Ding, S.-W.; Zhu, S. Skewer: A Fast and Accurate Adapter Trimmer for next-Generation Sequencing Paired-End Reads. *BMC Bioinform.* **2014**, *15*, 182. [[CrossRef](#)]
51. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)]
52. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
53. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Society. Ser. B (Methodol.)* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

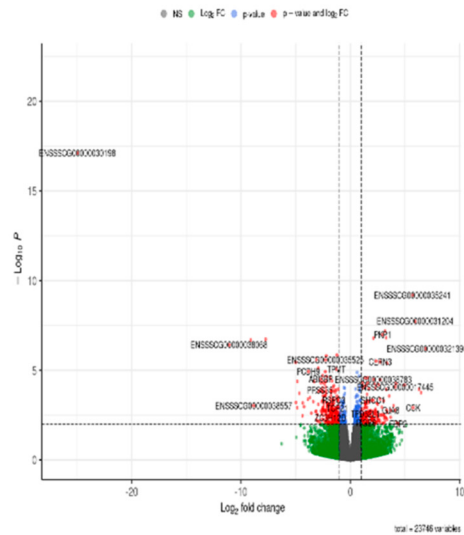
A Large litter (AI) vs Wild boar



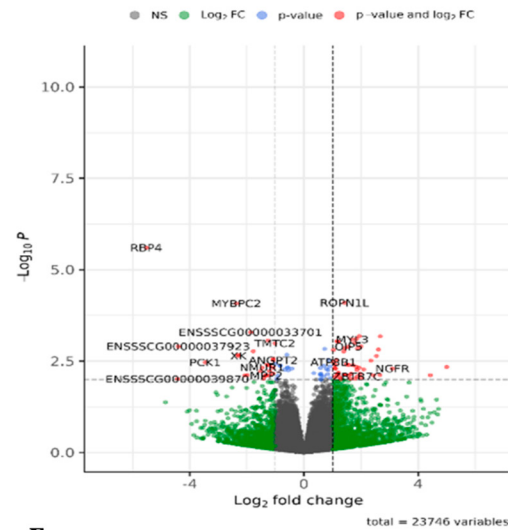
B Large litter (ET) vs Wild boar



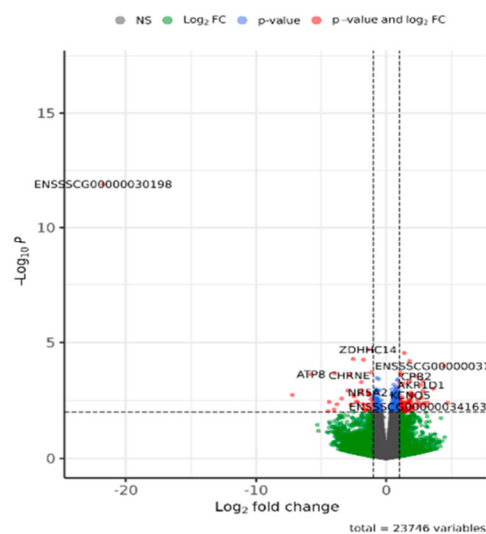
C Small litter (ET) vs Wild boar



D Large litter (ET) vs Small litter (ET)



E Large litter (AI) vs Small litter (ET)



F Large litter (AI) vs Large litter (ET)

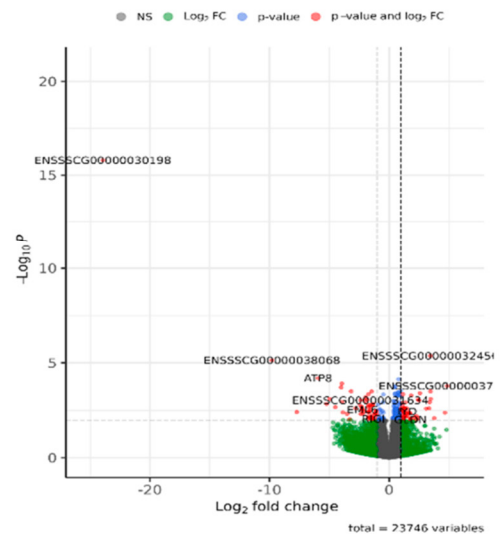


Figure S1. Volcano plots showing differentially expressed genes' comparison in the placentas with (A) the large litter obtained by artificial insemination (AI) vs wild boar, (B) large litter obtained by embryo transfer (ET) vs wild boar, (C) small litter (ET) vs wild boar, (D) large litter (ET) vs small litter (ET), (E) large litter (AI) vs small litter (ET) and (F) large litter (AI) vs large litter (ET). The most variable genes are identified by red dots.

Table S1. List of primers for real-time quantitative PCR.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Fpn</i>	TCGCCTAGTGTCATGACCAG	CAGAAACACAGACACCGCAA
<i>Tfr1</i>	GCCGAAGTGGCTGGTCATC	CAGACTCAGACCCATCTCCCT
<i>Dmt1</i>	GCAGGTGGTTGACGTCTGTA	CACGCCCCCTTTGTAGATGT
<i>Lft</i>	TGTTTGGACGGAACAGACCC	CTCATGGCTGGTCGGCAATA
<i>Rpl4</i>	CTCAGCGAATGAGAGCTGGT	GTGTTTCGGCGCATTGTCTT
<i>Cp</i>	AGGTCCACAACCTTCATGCCG	GTGCGTGTTTCACCTGGTACT
<i>HephL</i>	CTGTGCTTACCCACGTTGTC	GAAGGAAGGGACAAGGTCA
<i>Heph</i>	TCGCATCTTTCCAGCCACCT	GTGCTTGCATGCCACCTTTC
<i>Atp7b</i>	TGGGATCGGCTGCAAAGTCA	GGCCGCATCTGTTTCTGAGG
<i>Sod1</i>	AAGGCCGTGTGTGTGCTGAA	TGCACTGGTACAGCCTTGTGT

Table S2. List of antibodies.

	protein		dilution		dilution
Western blotting	Fpn	FPN1 Polyclonal antibody, #PA5-22993 (Invitrogen)	1:1000	Goat anti-rabbit polyclonal, #A6154 (Sigma-Aldrich)	1:10000
	β -Actin	Mouse monoclonal, #MA5-11869, (Thermo Fisher)	1:1000	Goat anti-mouse polyclonal, #A5278 (Sigma-Aldrich)	1:10000
	L-Ft	Rabbit polyclonal, #ab69090, (Abcam)	1:1000	Goat anti-rabbit polyclonal, #A6154 (Sigma-Aldrich)	1:10000
	Cp	Goat-anti human, #C0911, (Sigma- Aldrich)	1:1000	Donkey anti-goat, polyclonal, #sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology)	1:10000
	DMT1	Rabbit polyclonal, #NRAMP22-A, Alpha Diagnostic,	1:1000	Goat anti-rabbit polyclonal, #A6154 (Sigma-Aldrich)	1:1000
Immunofluorescence (IF) staining	Heph	Mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology), sc-365365	1:100	Goat anti-mouse conjugated with Alexa488® fluorochrome (Jackson ImmunoResearch)	1:500
	Cp	Rabbit polyclonal anti-Cp antibody (Dako) Q0121	1 : 100	Goat anti-rabbit conjugated with Cy3® fluorochrome (Jackson ImmunoResearch)	1:500
	Zp	Rabbit polyclonal, US Biological, No. 036510	1:100	Goat anti-rabbit conjugated with Cy3® fluorochrome (Jackson ImmunoResearch)	1:500
	Fpn	Goat polyclonal, Invitrogen, #PA5-143047	1:150	Donkey anti-goat conjugated with Alexa Fluor Plus 488 fluorochrome (Invitrogen)	1:500
	Fpn	Rabbit polyclonal, Alpha Diagnostic, #MTP11-A	1: 150	Goat anti-rabbit conjugated with Cy3® fluorochrome (Jackson ImmunoResearch)	1:500