

**ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНАЯ АНЕМИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС
КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ В ПУШНОМ ЗВЕРОВОДСТВЕ*****Н.А. БАЛАКИРЕВ, А.А. ДЕЛЬЦОВ[✉], С.В. ПОЗЯБИН, В.И. МАКСИМОВ**

Железо — эссенциальный микроэлемент, необходимый для осуществления многих процессов в организме (регуляция обмена веществ, синтез ДНК и АТФ, перенос кислорода, тканевое дыхание, эритропоэз, иммунный ответ). У пушных зверей клеточного содержания железодефицитная анемия приводит к значительным экономическим потерям вследствие снижения жизнеспособности и плодовитости, ухудшения качества получаемой пушнины. Поэтому изучение причин возникновения этого микроэлемента, разработка фармакологических средств и методических приемов его профилактики и лечения остаются актуальными проблемами. В своем сообщении мы приводим данные, подтверждающие моделирование этой патологии на основе атравматичного подхода — с помощью предложенной нами диеты, которая доступна по стоимости и входящим в ее состав ингредиентам. В качестве модельного объекта использовали белых крыс, которые по физиологическим особенностям более схожи с пушными зверьями, чем другие лабораторные животные. Целью исследования было экспериментальное моделирование железодефицитной анемии у лабораторных крыс, чтобы в будущем экстраполировать полученные на этой модели результаты на пушных зверей. Из 4-месячных белых беспородных нелинейных лабораторных крыс массой 200 г сформировали две группы по 10 особей. Контрольные животные получали общепринятый сбалансированный рацион (Дельта Фидс — корм для лабораторных крыс и мышей Р-22, АО «БиоПро», Россия), соответствующий нормам потребления для лабораторных крыс (белки — 4 г, жиры — 2 г, углеводы — 25 г, клетчатка — 0,5-1,0 г); в опытной группе специально разработанный рацион 4-кратно ограничивал поступление железа в организм, но соответствовал нормам кормления по содержанию питательных веществ, витаминов и минералов (исключая железо). После 45 сут у особей в опытной группе развивалась железодефицитная анемия: по сравнению с контролем (особи, получавшие бездефицитную по железу диету) в крови достоверно ($p \leq 0,05$) уменьшалось содержание гемоглобина на 37,5 г/л, гематокрита — на 21,35 %, числа эритроцитов — на $3,57 \times 10^{12}/л$, концентрации сывороточного железа — на 18,44 мкмоль/л, среднего объема эритроцита — на 14,02 фл, среднего содержания гемоглобина в эритроците — на 6,26 пг, в эритроцитарной массе — на 73,29 г/л, регистрировалась гипохромия и микроцитоз. С 17-х сут эксперимента у животных отмечали одышку и учащение сердцебиения, с 24-х сут регистрировали понижение температуры, что указывает на развитие анемического синдрома. До 14-х сут цвет кожных покровов и слизистых оболочек, а также общее состояние животных в обеих группах соответствовали норме, после 14-х сут у крыс, получавших экспериментальный рацион с ограниченным содержанием железа, наблюдали анемичность кожного покрова и слизистых оболочек ротовой полости, а также вялость и угнетение общего состояния. Полученные нами результаты продемонстрировали возможность эффективно моделировать железодефицитную анемию лабораторных крыс, минимизируя стресс и исключая физическую и психическую травматизацию животных, риск их гибели, а также побочные эффекты. Модель успешно применена при оценке эффективности комплексного микроэlementного препарата на основе полимальтозного комплекса гидроксида Fe^{3+} . В дальнейшем мы планируем использовать модель железодефицитной анемии крыс для разработки приемов профилактики и коррекции этой патологии у пушных зверей.

Ключевые слова: пушное звероводство, железодефицитная анемия, препараты железа, моделирование анемии, лабораторные крысы.

Железо относится к эссенциальным микроэлементам со сложным метаболизмом, системой рециркуляции и контролем содержания, что позволяет говорить о гомеостазе Fe в организме (1-4). Неорганическое железо, поступающее с пищей (5), в основном находится в трехвалентной форме Fe^{3+} . Оно всасывается слизистой оболочкой 12-перстной кишки при участии бета-3-интегринина и мобилферрина — белка массой 56 кДа. В цитозоле поглощающей клетки железо связывается с комплексом, известным как параферритин, который содержит интегрин, мобилферрин и флавиномоноксигеназу. Этот комплекс служит ферриредуктазой и восстанавливает железо до двухвалентного состояния Fe^{2+} , в котором оно доступно для образования

* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ (договор № 20-016-00105/20 от 20.03.2020).

гемовых белков (6-8). В клетках слизистой оболочки кишечника железо в форме Fe^{3+} соединяется с белком апоферритином с образованием ферритина — основной формы депонирования этого микроэлемента (4, 9) (в костном мозге, печени, селезенке). Предполагают, что количество поступающего в кровь железа зависит от содержания апоферритина в стенках кишечника (10). Транспорт железа из кишечника в кровеносные органы осуществляется комплексом с белком плазмы крови трансферрином (8). В форме fumarата биодоступность железа повышается (11).

В организме соединения железа участвуют в окислительных реакциях. Гемоглобин служит переносчиком кислорода, миоглобин (белок скелетных мышц и сердечной мышцы) связывает кислород и создает резерв для восполнения его дефицита. Парентеральное и энтеральное введение солей железа повышает содержание гемоглобина в крови и железа — в сыроворотке крови (12-16). Железосодержащие ферменты цитохромы, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза обеспечивают тканевое дыхание, железо находится в простетической группе феррофлавопротеинов — ксантиноксидазы, сукцинатдегидрогеназы (17).

Таким образом, железо необходимо для осуществления базовых процессов в организме (регуляция обмена веществ, синтез ДНК и АТФ, перенос кислорода, тканевое дыхание, эритропоэз) (17-19), оно влияет на иммунорезистентность (20). Недостаток железа может вызвать нарушение превращения протопорфирина IX в гем. В результате увеличивается содержание порфиринов в эритроцитах (21). При дефиците железа развивается гематологический синдром, характеризующийся нарушением синтеза гемоглобина и проявляющийся эритроцитопенией и сидеропенией (пониженное содержание железа и железосодержащих ферментов) (22-24).

Многообразием функций Fe определяются значительные физиологические отклонения, вызванные железodefицитной анемией (25-27). В животноводстве его этиология в большинстве случаев связана с неправильным кормлением и ненадлежащим уходом за животными (26). На железodefицитную анемию приходится большая часть всех диагностируемых анемий (16, 28). При этой патологии замедляется рост и развитие животных (29-31), у пушных зверей в условиях промышленного разведения ухудшается состояние кожного и волосяного покровов, снижается качество пушнины (2, 32-34), включая ее физико-механические характеристики (35).

Распространенностью железodefицитной анемии у млекопитающих, ее опасными последствиями и причиняемым ущербом определяется объем фундаментальных физиолого-биохимических (36-40) и генетических исследований при этой патологии (18, 25, 41), как и практических разработок по компенсации железodefицитного состояния у человека (12, 42) и животных (13, 29-31, 43). Для этих целей в мировой практике широко используются железodefицитные диеты (18, 44-46), которые предложены для различных видов животных — грызунов, собак, кошек, кроликов, морских свинок, хорьков, свиней, овец, коз, коров, приматов и производятся в коммерческих масштабах, что позволяет стандартизировать дизайн проводимых экспериментов. Примером могут служить продукты Teklad компании «Envigo», США (<https://www.envigo.com/>) и AIN (диеты, одобренные American Institute of Nutrition) (46-48), рецептуры которых продолжают совершенствоваться. В подобных экспериментах также важен адекватный выбор биологической модели, позволяющий применить результаты, полученные на лабораторном животном, для решения практических задач (49). К наиболее распространенным модельным животным, используемым в биомеди-

цинских исследованиях, относятся крысы, обычно самцы (18), что позволяет исключить влияние изменений гормонального фона на результаты.

В звероводческих хозяйствах железодефицитная анемия относится к распространенным патологиям (34, 50, 51) и приводит к значительным экономическим потерям вследствие снижения жизнеспособности и плодовитости животных, ухудшения качества получаемой пушнины (26, 34, 52). Чаще всего железодефицитная анемия встречается у норок (2), в частности потому, что в их рацион входит морская рыба (34, 53), содержащая в большом количестве триметиламиноксид (ТМАО, или триокс), который связывает железо и переводит его из двухвалентного в не усвояемое трехвалентное. При регулярном потреблении такой рыбы у зверей, особенно у растущего молодняка, возникает дефицит железа (34, 53).

До настоящего времени в России в открытом доступе не было описаний способа получения экспериментальных моделей железодефицитной анемии, которые были бы аналогичны известным, но малозатратны, доступны, атравматичны и при этом достаточны для подбора средств фармакологической профилактики и лечения этого микроэлементоза и схем их применения в практике пушного звероводства. В своем сообщении мы приводим данные, подтверждающие возможность такого моделирования на крысах с помощью представленной в работе разработанной нами оригинальной диеты.

Целью нашего исследования было подтверждение развития экспериментальной железодефицитной анемии у лабораторных крыс при использовании рациона с ограниченным содержанием железа.

Методика. В эксперименте использовали физиологически здоровых самок белых беспородных лабораторных крыс ($n = 20$, возраст 4 мес, живая масса 200 г). По принципу пар-аналогов были сформированы две группы по 10 крыс в каждой. Условия содержания животных соответствовали Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (54). Крысы обеих групп находились в типовых клетках с соблюдением ветеринарных и зоотехнических требований согласно рекомендациям для биологических моделей (55). В качестве основного (контрольная I группа) использовали сбалансированный рацион (Дельта Фидс — корм для лабораторных крыс и мышей Р-22, АО «БиоПро», Россия), соответствующий нормам потребления для лабораторных крыс (белки — 4 г, жиры — 2 г, углеводы — 25 г, клетчатка — 0,5-1,0 г), вода вволю. Во II группе (опыт) крысы получали специально разработанный рацион (26 г индивидуально каждому животному 1 раз в сутки), который соответствовал возрастным нормам для животных этого вида по содержанию питательных, минеральных веществ и витаминов при снижении содержания Fe в корме (9,12 мг/кг против 35,00 мг/кг в контроле). В обеих группах доступ к воде не ограничивали. Продолжительность эксперимента — 45 сут.

В течение всего периода наблюдений у животных каждую неделю измеряли температуру тела, частоту сердечных сокращений (ЧСС), частоту дыхательных движений (ЧДД). Использовали регистратор PowerLab® 8/30, («ADInstruments Pty Ltd.», Австралия) и пьезокерамический датчик для регистрации ЧДД с разъемом типа BNC для подключения к регистратору, эластичную манжету для фиксации датчика (разных типоразмеров в зависимости от вида животного). Также оценивали общее состояние крыс.

По окончании эксперимента (на 45-е сут) провели гематологический анализ периферической крови, взятой у каждой лабораторной крысы из хвостовой вены с помощью иглы в пробирку с антикоагулянтом. Определяли число эритроцитов и количество гемоглобина (56), гематокрит (57),

средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците и в эритроцитарной массе, а также содержание железа в сыворотке крови (58).

Из крыс с железodefицитной анемией, смоделированной по предложенной нами методике ($n = 10$), сформировали две группы (по $n = 5$) для изучения эффективности нового комплексного микроэлементного препарата на основе полимальтозного комплекса гидроксида Fe^{3+} (ООО «А-БИО», г. Москва). Животные в I группе служили контролем — крысы продолжали получать разработанный нами рацион, во II группе его дополняли комплексным микроэлементным препаратом в дозе 0,1 мл каждому животному. Через 30 сут проводили гематологическое исследование периферической крови, как описано выше.

Статистический анализ полученных данных выполняли в программе Microsoft Excel. Определяли среднее арифметическое значения измеряемого показателя (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm SEM$). Для оценки достоверности различий между сравниваемыми средними использовали t -критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Результаты. Изучение эффективности и безопасности фармакологически активных соединений на экспериментальных моделях — необходимый предварительный этап поиска средств для лечения и профилактики микроэлементозов пушных зверей.

Известны разные схемы моделирования железodefицитной анемии животных. Например, у свиней (59) и крыс (60) этот микроэлементоз индуцировали кровопусканием (blood-removing induced anemia). В российские исследователи предлагали подкожно вводить препарат Дефероксамин (по 0,5 г/кг дважды с интервалом 3 сут, Патент RU 2553344 C1, опублик. 10.06.2015, Бюл. № 16) (61). Существенный недостаток предложенного способа — множественные негативные побочные эффекты. Еще одна методика предполагает введение препарата Десферала® (также комплексобразующее соединение, дозировка и кратность введения авторами не указаны) (60, 61). Однако эти приемы травматичны (вплоть до риска гибели животных) и вызывают сильный стресс у подопытных животных (61), что искажает результаты эксперимента. В мировой практике используют стандартизированные железodefицитные диеты (18, 44-46). В России сообщалось о применении рациона с содержанием железа 27 мг/кг для индукции экспериментальной железodefицитной анемии у крыс, но состав рациона автором не указан (61).

1. Рацион для моделирования железodefицитной анемии у белых лабораторных крыс

Ингредиент	Суточная доза для животного, г
Хлористый натрий	0,3
Магний сернокислый 7-водный	0,01
Фосфат натрия	0,4
Кальция глюконат	0,55
Хлористый калий	0,02
Микрокристаллическая целлюлоза	0,25
Чайный порошок	0,08
Витаминная смесь	0,003
Масло подсолнечное	2,0
Абиопептид сухой	2,0
Манная крупа	20,0
Кукурузный крахмал	0,67

Примечание. По составу витаминная смесь рациона специально подобрана и содержит следующие компоненты (одна суточная доза): ацетат α -токоферола (0,24 мг), аскорбиновая кислота (1,8 мг), пантотенат кальция (0,072 мг), никотинамид (0,48 мг), гидрохлорид пиридоксина (0,072 мг), пальмитат ретинола (0,044 мг), рибофлавин (0,048 мг), рутозид (0,24 мг), гидрохлорид тиамин (0,048 мг), фолиевая кислота (1,68 мкг), цианкобаламин (0,048 мкг). Каждая крыса получала индивидуально 26 г смеси в сутки.

Для индукции железодефицитной анемии нами предложен и испытан рацион, состав которого представлен в таблице 1.

При разработке экспериментальной модели важен адекватный выбор животного (44, 49). Чаще всего биологическими моделями служат мыши (43, 62) и крысы (15, 18, 25, 39, 44). В нашем опыте модельными животными были крысы, которые более схожи с пушными зверьями, и в частности с норками, по физиолого-биохимическим особенностям. Важное преимущество крыс как лабораторных животных заключается и в том, что они довольно устойчивы к инфекционным заболеваниям. Обычно используют самцов (18), а также самок в возрасте 3-5 мес (до 6-месячного возраста к размножению приступают только около 1 % особей) (54, 55). Мы использовали 4-месячных самок белых беспородных лабораторных крыс, исходя из того, что, в частности, у норок именно железодефицитная анемия самок представляет серьезную проблему. Страдающие анемией взрослые племенные самцы большей частью стерильны, а у самок снижается живая масса, отмечается высокий процент бесплодия, каннибализм, утрата материнского инстинкта (52). Их щенки имеют сниженную массу при рождении, часто страдают от нарушения пищеварения, плохо растут, часто погибают в раннем возрасте, а выжившие остаются мелкими и даже карликовыми (52).

В нашем эксперименте у лабораторных крыс из группы, получавшей экспериментальный рацион, в сравнении с контролем в крови достоверно ($p \leq 0,05$) снижалось содержание гемоглобина, гематокрит, число эритроцитов и концентрация сывороточного железа также уменьшались (соответственно на 37,5 г/л, 21,35 %, $3,57 \times 10^{12}$ /л и 18,44 мкмоль/л), регистрировалась гипохромия и микроцитоз (табл. 2), что служит характерными признаками железодефицитной анемии.

2. Гематологические показатели у белых лабораторных крыс, характеризующие состояние железодефицитной анемии ($M \pm SEM$)

Показатель	I (контрольная) группа ($n = 10$)	II группа ($n = 10$)
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	7,82 \pm 0,43	4,25 \pm 0,37*
Гемоглобин, г/л	121,1 \pm 6,2	83,6 \pm 0,4*
Гематокрит, %	44,58 \pm 3,55	23,23 \pm 2,18*
Средний объем эритроцита, фл	62,26 \pm 6,17	51,24 \pm 3,16*
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	22,64 \pm 2,32	16,38 \pm 1,13*
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитарной массе, г/л	348,45 \pm 20,11	275,16 \pm 28,12*
Концентрация сывороточного железа, мкмоль/л	45,68 \pm 2,74	27,24 \pm 3,82*

Примечание. Группы сформированы из 4-месячных крыс, продолжительность эксперимента 45 сут.

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Выявленные нами достоверные гематологические изменения аналогичны описанным у животных других видов, где эти показатели — уменьшение содержания гемоглобина (40), снижение гематокрита (63), эритроцитопения, уменьшение концентрации сывороточного железа, а также гипохромия и микроцитоз (64) — характеризуют состояние железодефицитной анемии.

3. Динамика показателей физиологического состояния белых лабораторных крыс при экспериментальной железодефицитной анемии ($M \pm SEM$)

Время, сут	Группа животных ($n = 10$)	Показатель		
		ЧДД	ЧСС	T
За 1 сут до начала эксперимента	I	99 \pm 7	398 \pm 20	37,3 \pm 0,2
	II	98 \pm 10	402 \pm 15	37,4 \pm 0,3
3-и	I	101 \pm 11	411 \pm 21	37,5 \pm 0,3
	II	106 \pm 9	409 \pm 19	37,3 \pm 0,2

10-е	I	102±8	387±18	37,4±0,3
	II	112±11	406±21	37,5±0,4
17-е	I	109±8	395±12	37,6±0,4
	II	129±9*	428±10*	37,4±0,4
24-е	I	112±11	403±16	37,4±0,3
	II	132±8*	429±17	36,4±0,4*
31-е	I	99±7	409±15	37,3±0,3
	II	133±8*	439±14*	36,5±0,4*
38-е	I	110±9	413±16	37,5±0,2
	II	138±10*	448±15*	36,8±0,4*
45-е	I	104±6	404±18	37,4±0,3
	II	137±8*	453±21*	36,9±0,4

Примечание. Группы сформированы из 4-месячных крыс. ЧДД — частота дыхательных движений, ЧСС — частоты сердечных сокращений, Т — температура тела.

* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Железодефицитная анемия, индуцированная у крыс из II группы, повлияла на физиологическое состояние животных — частоту дыхательных движений, частоту сердечных сокращений и температуру тела (табл. 3). Следовательно, организм лабораторных крыс из опытной группы в целом реагировал на развитие болезни, при этом с 17-х сут начались значительные изменения, когда у животных отмечали одышку и учащение сердцебиения, а с 24-х сут регистрировали понижение температуры, что указывает на развитие анемического синдрома.

В течение опыта мы также оценивали цвет кожных покровов и слизистых оболочек и общее состояние животных. До 14-х сут эти показатели у лабораторных крыс из опытной и контрольной групп соответствовали норме. Через 2 нед у крыс, получавших экспериментальный рацион с ограниченным содержанием железа, наблюдали анемию кожного покрова и слизистых оболочек ротовой полости, а также вялость и угнетение общего состояния.

Лабораторных крыс с железодефицитной анемией, смоделированной по нашей методике, далее использовали для изучения эффективности нового комплексного микроэлементного препарата на основе полимальтозного комплекса гидроксида Fe^{3+} (табл. 4). Исследуемый препарат в 1 мл содержит в качестве действующих веществ $Fe(III)$ — 50 мг, Cu — 0,1 мг, Co — 0,2 мг, Se — 0,07 мг, Mn — 0,6-0,7 мг, Zn — 0,6-0,7 мг. В качестве вспомогательных веществ в препарате присутствуют метилгидроксibenзоат — 1,5 г, пропиленгидроксibenзоат — 0,15 г, сахароза — 100 г, сорбит — 140 г (вода питьевая — до 1,0 л). По внешнему виду препарат представляет собой непрозрачную жидкость красно-бурого цвета без запаха.

4. Гематологические показатели у белых лабораторных крыс с экспериментальной железодефицитной анемией в опыте по изучению действия комплексного микроэлементного препарата на основе полимальтозного комплекса гидроксида Fe^{3+} ($M \pm SEM$)

Показатель	В начале эксперимента	
	I (контрольная) группа ($n = 5$)	II группа ($n = 5$)
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,42±1,63	4,35±0,31
Гемоглобин, г/л	81,8±0,4	82,3±0,8
Гематокрит, %	23,34±1,82	22,27±2,32
Средний объем эритроцита, фл	61,21±1,19	58,45±3,63*
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	16,45±3,56	15,91±2,17
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитарной массе, г/л	278,65±15,41	271,92±21,78
Концентрация сывороточного железа, мкмоль/л	24,91±3,93	26,85±3,14*
В конце эксперимента		
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	5,14±0,24*	7,71±0,39*
Гемоглобин, г/л	85,3±5,2*	118,7±4,8*

		<i>Продолжение таблицы 4</i>
Гематокрит, %	36,41±3,82*	44,12±2,74*
Средний объем эритроцита, фл	58,92±7,46	57,44±5,31
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	15,35±3,19*	23,54±2,71*
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитарной массе, г/л	288,56±19,53*	353,27±16,25*
Концентрация сывороточного железа, мкмоль/л	27,65±2,71*	46,32±1,68*
Примечание. Продолжительность эксперимента 30 сут. Производитель препарата — ООО «А-БИО», (г. Москва).		
* Различия с контролем статистически значимы при $p \leq 0,05$.		

В конце эксперимента (через 30 сут) у крыс из I (контрольной) группы гематологические показатели (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднее содержание гемоглобина в эритроцитарной массе и концентрация сывороточного железа) все еще были снижены — соответственно на $2,57 \times 10^{12}/л$, 33,4 г/л, 7,71 %, 8,19 пг, 64,71 г/л и 14,67 мкмоль/л. У крыс из II (опытной) группы гематологические показатели нормализовались, что свидетельствовало об устранении железодефицитной анемии. Таким образом, получен положительный опыт использования разработанной модели экспериментальной железодефицитной анемии при оценке эффективности схем ее коррекции. Показано, что применение комплексного микроэлементного препарата микроэлементного препарата на основе полимальтозного комплекса гидроксида Fe^{3+} позволило нормализовать гематологические показатели (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднее содержание гемоглобина в эритроцитарной массе и концентрация сывороточного железа) у лабораторных крыс после моделирования железодефицитной анемии.

По результатам проведенных экспериментов можно утверждать, что нами предложена модель железодефицитной анемии у лабораторных крыс, которая эффективна, атравматична, малозатратна, доступна и достаточна для решения задач практического звероводства при оценке эффективности разрабатываемых приемов коррекции этой патологии (13, 15, 32, 42) и безопасности применяемых средств, принимая во внимание патофизиологическое действие избытка железа (65–68).

R.M. Kaufman и P. Simeon (44) изучали влияние железодефицитной диеты на адсорбцию железа у крыс массой 200–350 г. Общее содержание железа в использованной в работе диете составляло 3,90 мкг/г (суточное потребление корма 10 г); в стандартном коммерческом корме содержание железа составляло 186 мкг/г (суточное потребление корма — 10–15 г). Авторы пришли к выводу, что всасывание железа контролируется истощением его запасов из иного пула, чем в печени и эритроцитах. Основанием послужили данные, что при недостатке железа в пище его всасывание у крыс усиливалось (после не менее чем 5 сут ограниченного потребления железа), недостаток железа в корме не влиял на эритропоэз, и до 14-х сут содержание сывороточного железа у животных в опытной группе не отличалось от нормального (44). Время наблюдений в зависимости от варианта эксперимента при этом составляло от 2 до 30 сут (44). Эти и другие имеющиеся данные указывают на то, что адаптивные реакции организма и гомеостаз железа (4, 36, 44, 67) необходимо учитывать при разработке модели железодефицитной анемии. В предложенной нами модели суточное потребление корма составило 26 г, содержания железа в предлагаемом рационе — 9,12 мг/кг против 35,00 мг/кг в контроле, то есть разница была примерно 4-кратной против 48-кратной в сообщении R.M. Kaufman и P. Simeon (44). Наш опыт

длился 45 сут, при этом у лабораторных крыс количество гемоглобина, гематокрит, число эритроцитов, концентрация сывороточного железа, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците и среднее содержание гемоглобина в эритроцитарной массе достоверно уменьшались. Дополнительные наблюдения подтвердили, что с 17-х сут общее состояние и физиологические показатели животных изменялись и развивался анемический синдром.

Итак, полученные нами результаты продемонстрировали возможность эффективно моделировать железодефицитную анемию лабораторных крыс, минимизируя стресс и исключая физическую и психическую травматизацию животных, риск их гибели и недостоверность полученных результатов, с помощью предложенной нами доступной диеты. Железодефицитное состояние животных при этом характеризовалось следующими гематологическими показателями: снижением ($p \leq 0,05$) содержания гемоглобина на 37,5 г/л, гематокрита — на 21,35 %, числа эритроцитов — на $3,57 \times 10^{12}/л$, концентрации сывороточного железа — на 18,44 мкмоль/л, среднего объема эритроцита — на 14,02 фл, среднего содержания гемоглобина в эритроците — на 6,26 пг, в эритроцитарной массе — на 73,29 г/л по сравнению с контролем (бездефицитная по железу диета). С 17-х сут эксперимента у животных отмечали одышку и учащенное сердцебиение, с 24-х сут у них снижалась температура тела, что указывает на развитие анемического синдрома. До 14-х сут цвет кожных покровов и слизистых оболочек, а также общее состояние животных в обеих группах соответствовали норме, но после 14-х сут у крыс, получавших корм с ограниченным содержанием железа, наблюдали анемию кожного покрова и слизистых оболочек ротовой полости, а также вялость и угнетение общего состояния. Предложенная модель была успешно применена для изучения действия комплексного микроэлементного препарата на основе полимальтозного комплекса гидроксида Fe^{3+} . В дальнейшем мы планируем использовать модель железодефицитной анемии крыс при разработке приемов профилактики и коррекции железодефицитной анемии у других животных, в том числе у пушных зверей, которые по своим биологическим особенностям и физиологии схожи с крысами.

*ФГБОУ ВО Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии
им. К.И. Скрябина,
109472 Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
e-mail: Balakirev@mgavm, deltsov-81@mail.ru ✉, rector@mgavm,
dr.maximov@gmail.com*

*Поступила в редакцию
16 марта 2022 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2022, V. 57, № 4, pp. 718-729

IRON DEFICIENCY ANEMIA IN LABORATORY RATS TO BE USED AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR FARMED FUR-BEARING ANIMALS

N.A. Balakirev, A.A. Deltsov✉, S.V. Pozyabin, V.I. Maximov

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika K.I. Skryabina, Moscow, 109472 Russia, e-mail Balakirev@mgavm, deltsov-81@mail.ru (✉ corresponding author), rector@mgavm, dr.maximov@gmail.com

ORCID:

Balakirev N.A. orcid.org/0000-0001-8980-263X

Pozyabin S.V. orcid.org/0000-0002-3825-6082

Deltsov A.A. orcid.org/0000-0002-0385-0321

Maximov V.I. orcid.org/0000-0002-5305-0218

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the grant from the Russian Foundation for Basic Research (Agreement No. 20-016-00105/20)

Abstract

Iron is an essential trace element necessary for the implementation of many processes in the body (metabolism regulation, DNA and ATP synthesis, oxygen transfer, tissue respiration, erythropoiesis, immune response). In caged fur animals, iron deficiency anemia leads to significant economic losses due to a decrease in viability and fertility, and a deterioration in the fur quality. Therefore, the study of the causes of this microelementosis, the development of pharmacological agents and techniques for its prevention and treatment remain a topical issue. In our report, we present data confirming the modeling of this pathology using an atraumatic approach, i.e., the diet we proposed, which is low in cost and simple in its ingredients. As a model object, white rats were used, which, in terms of physiological parameters, are more similar to fur-bearing animals than other laboratory animals. The aim of the study was experimental modeling of iron deficiency anemia in laboratory rats in order to extrapolate the results obtained on this model to fur animals in the future. From 4-month-old white outbred laboratory rats weighing 200 g, two groups of 10 individuals were formed. Control animals received a generally accepted balanced diet which corresponded to the consumption norms for laboratory rats and was 4 g proteins, 2 g fats, 25 g carbohydrates, and 0.5-1.0 g fiber. In the experimental group a specially developed diet was applied which was 4 times less in the iron content, but corresponded to the feeding norms in terms of the nutrients, vitamins and minerals (excluding iron). After 45 days, the rats in the experimental group developed iron deficiency anemia. As compared to the control rats, receiving a diet not deficient in iron, there was a significant ($p \leq 0.05$) decrease in hemoglobin (by 37.5 g/l), hematocrit (by 18.35 %), the number of erythrocytes (by $3.57 \times 10^{12}/l$), the concentration of serum iron (by 18.44 $\mu\text{mol}/l$), the average volume of erythrocyte (by 14.02 fl), the average content of hemoglobin per erythrocyte (by 6.26 pg) and per erythrocyte mass (by 73.29 g/l). The anemia of the animals was hypochromi and macrocytic. From day 17 of the experiment, shortness of breath and increased heart rate occurred, from day 24, the body temperature decreased which indicates the development of an anemic syndrome in the rats. Up to day 14, the color of the skin and mucous membranes, as well as the general condition of the rats in both groups corresponded to the norm. After day 14, anemic skin and mucous membranes of the oral cavity were observed in rats receiving an experimental diet with a limited iron content. In addition, lethargy and general depression occurred. Our results demonstrated the ability to effectively simulate iron deficiency anemia in laboratory rats, minimizing stress and eliminating physical and mental traumatization of animals, the risk of their death, and side effects. The model has been successfully applied in evaluating the effectiveness of a complex microelement preparation based on a polymaltose complex of Fe^{3+} hydroxide. In the future, we plan to use the model of iron deficiency anemia in rats to develop methods for the prevention and correction of this pathology in farmed fur-bearing animals.

Keywords: fur farming, iron deficiency anemia, iron preparations, anemia modeling, laboratory rats.

REFERENCES

1. Naigamwalla D.Z., Webb J.A., Giger U. Iron deficiency anemia. *Canadian Veterinary Journal*, 2012, 53(3): 250-256.
2. Balakirev N.A., Maksimov V.I., Staroverova I.N., Zaytsev S.Yu., Balakirev A.N. *Biologicheskaya rol' mineral'nykh veshchestv v kletochnom pushnom zverovodstve (norkovodstve)* [Biological role of minerals in fur animal raised in cages (rabbit breeding)]. Moscow, 2017 (in Russ.).
3. Meneghini I.R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 23: 783-792 (doi: 10.1016/s0891-5849(97)00016-6).
4. Anderson G.J., Frazer D.M. Current understanding of iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2017, 106(suppl_6): 1559S-1566S (doi: 10.3945/ajcn.117.155804).
5. Lavrik N.G. V sbornike: *Nauchnye trudy Sibirskogo NIVI* [In: Scientific works of the Siberian Research Institute NIVI]. Moscow, 1979, vol. 36: 55-57 (in Russ.).
6. Bineev R.G. *Tezisy X Vsesoyuznoy konferentsii po mikrosistemam* [Abstracts of the X All-Union Conference on microsystems]. Cheboksary, 1986: 45-47 (in Russ.).
7. Johnson G. Bioavailability and the mechanisms of intestinal absorption of iron from ferrous ascorbate and ferric polymaltose in experimental animals. *Experimental Hematology*, 1990, 18: 1064-1069.
8. Umbreit J.N., Conrad M.E., Moore E.G., Latour L.F. Iron absorption and cellular transport: the mobilferrin/paraferritin paradigm. *Seminars in Hematology*, 1998, 35(1): 13-26.
9. Arosio P., Elia L., Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, 2017, 69: 414-422 (doi: 10.1002/iub.1621).
10. *Clinical biochemistry of domestic animals*. J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss (eds.). Academic Press, 1997.

11. Li Y.O., Diosady L.L., Wesley A.S. Iron in vitro bioavailability and iodine storage stability in double-fortified salt. *Food Nutr. Bull.*, 2009, 30(4): 327-335 (doi: 10.1177/156482650903000403).
12. Danielson B.G. Intravenous iron therapy efficacy and safety of iron sucrose, prevention and management of anemia in pregnancy and postpartum hemorrhage. *Zurich: Schelenberg*, 1998: 93-106.
13. Nikonova E.B. *Veterinarnaya patologiya*, 2005, 2: 63-66 (in Russ.).
14. Nenortiene P. Preparation, analysis and anti-anemic action of peroral powders with ferrous oxalate. *Medicina (Kaunas)*, 2002, 38(1): 69-76.
15. Skrypnik K., Bogdański P., Sobieska M., Schmidt M., Suliburska J. Influence of multistrain probiotic and iron supplementation on iron status in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, 1(68): 126849 (doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126849).
16. Culeddu G., Li Su, Cheng Y., Pereira D., Payne R.A., Powell J.J., Hughes D.A. Novel oral iron therapy for iron deficiency anaemia: how to value safety in a new drug? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2022, 88(3): 1347-1357 (doi: 10.1111/bcp.15078).
17. *Iron-containing enzymes: versatile catalysts of hydroxylation reactions in nature*. S.P. de Visser, D. Kumar. The Royal Society of Chemistry Publishing, 2011.
18. Fiddler J.L., Clarke S.L. Evaluation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in a male rat model of dietary iron deficiency. *Genes and Nutrition*, 2021, 16(1): 17 (doi: 10.1186/s12263-021-00698-0).
19. Balakirev N.A., Maksimov V.I., Del'tsov A.A. *Mineral'no-vitaminnoe pitanie pushnykh zverey kletchnogo sodержaniya: monografiya* [Mineral and vitamin nutrition of fur-bearing animals in cage raising: a monograph]. Moscow, 2021 (in Russ.).
20. Ni S., Yuan Y., Kuang Y., Li X. Iron metabolism and immune regulation. *Front. Immunol.*, 2022, 13: 816282 (doi: 10.3389/fimmu.2022.816282).
21. Parakhnevich A.V. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 2012, 19(2): 189-190 (in Russ.).
22. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *The New England Journal of Medicine*, 2015, 372(19): 1832-1843 (doi: 10.1056/NEJMra1401038).
23. Gorodetskiy V.V. *Zhelezodefitsitnye sostoyaniya i zhelezodefitsitnye anemii: diagnostika i lechenie* [Iron deficiency conditions and iron deficiency anemia: diagnosis and treatment]. Moscow, 2004 (in Russ.).
24. Killip S., Bennett J.M., Chambers M.D. Iron deficiency anemia. *Am. Fam. Physician*, 2007, 75(5): 671-678.
25. Cottin S.C., Gambling L., Hayes H.E., Stevens V.J., McArdle H.J. Pregnancy and maternal iron deficiency stimulate hepatic CRBP2 expression in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 32: 55-63 (doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.005).
26. Balakirev N.A., Perel'dik D.N., Domskiy I.A. *Soderzhanie, kormlenie i bolezni kletchnykh pushnykh zverey* [Maintenance, feeding and diseases of fur-bearing animals in cage raising]. Moscow, 2013 (in Russ.).
27. Staron R., Lipinski P., Lenartowicz M., Bednarz A., Gajowiak A., Smuda E., Krzeptowski W., Pieszka M., Korolonek T., Hamza I., Swinkels D., Swelm R.V., Starzyński R. Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0181117 (doi: 10.1371/journal.pone.0181117).
28. Lopez A., Cacoub P., Macdougall I.C., Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*, 2016, 387(10021): 907-916 (doi: 10.1016/S0140-6736(15)60865-0).
29. 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 (Basel)*, 2018, 11(4): 128 (doi: 10.3390/ph11040128).
30. Bhattarai S., Framstad T., Nielsen J.P. Iron treatment of pregnant sows in a Danish herd without iron deficiency anemia did not improve sow and piglet hematology or stillbirth rate. *Acta Vet. Scand.*, 2019, 61: 60 (doi: 10.1186/s13028-019-0497-6).
31. Asadi M., Toghdory A., Hatami M., Ghassemi Nejad J. Milk supplemented with organic iron improves performance, blood hematology, iron metabolism parameters, biochemical and immunological parameters in suckling Dalagh lambs. *Animals (Basel)*, 2022, 12(4): 510 (doi: 10.3390/ani12040510).
32. Balakirev N.A., Maksimov V.I., Del'tsov A.A. *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Baumana*, 2021, 2: 19-25 (in Russ.).
33. Balakirev N.A., Del'tsov A.A., Maksimov V.I. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*, 2021, 3: 55-60 (doi: 10.52178/00234885.2021.3.55) (in Russ.).
34. Havre G., Helgebostad A., Ender F. Iron resorption in fish-induced anaemia in mink. *Nature*, 1967, 215: 187-188 (doi: 10.1038/215187a0).
35. Staroverova I.N., Maksimov V.I., Balakirev N.A., Pozyabin S.V., Zaytsev S.Yu., Del'tsov A.A. Relationship of dielectric properties of the hair cover with its morphophysiological and biochemical characteristics in farmed fur-bearing animals. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(4): 809-818 (doi: 10.15389/agrobiol.2021.4.809rus).
36. Fisher A.L., Sangkhae V., Presicce P., Chougnat C.A., Jobe A.H., Kallapur S.G., Tabbah S., Buhimschi C.S., Buhimschi I.A., Ganz T., Nemeth E. Fetal and amniotic fluid iron homeostasis

- in healthy and complicated murine, macaque, and human pregnancy. *JCI Insight*, 2020, 5(4): e135321 (doi: 10.1172/jci.insight.135321).
37. Davis M.R., Hester K.K., Shawron K.M., Lucas E.A., Smith B.J., Clarke S.L. Comparisons of the iron deficient metabolic response in rats fed either an AIN-76 or AIN-93 based diet. *Nutr. Metab. (Lond)*, 2012, 9(1): 95 (doi: 10.1186/1743-7075-9-95).
 38. Abbaspour N., Hurrell R., Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci.*, 2014, 19(2): 164-174.
 39. Asowata E.O., Olusanya O., Abaakil K., Chichger H., Srail S.K., Unwin R.J., Marks J. Diet-induced iron deficiency in rats impacts small intestinal calcium and phosphate absorption. *Acta Physiologica*, 2021, 232(2): e13650 (doi: 10.1111/apha.13650).
 40. Perry A. An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on post-weaning performance. *Journal of Swine Health and Production*, 2016, 24(1): 10-20.
 41. Soliman A.T., De Sanctis V., Yassin M., Soliman N. Iron deficiency anemia and glucose metabolism. *Acta Biomed.*, 2017, 88(1): 112-118 (doi: 10.23750/abm.v88i1.6049).
 42. Pasini E., Corsetti G., Romano C., Aquilani R., Scarabelli T., Chen-Scarabelli C., Dioguardi F.S. Management of anaemia of chronic disease: beyond iron-only supplementation. *Nutrients*, 2021, 13(1): 237 (doi: 10.3390/nu13010237).
 43. Karshalev E., Zhang Y., Esteban-Fernández de Ávila B., Beltrán-Gastélum M., Chen Y., Mundaca-Urbe R., Zhang F., Nguyen B., Tong Y., Fang R.H., Zhang L., Wang J. Micromotors for active delivery of minerals toward the treatment of iron deficiency anemia. *Nano Lett.*, 2019, 19(11): 7816-7826 (doi: 10.1021/acs.nanolett.9b02832).
 44. Kaufman R.M., Simeon P. Iron-deficient diet: effects in rats and humans. *Blood*, 1966, 28(5): 726-737.
 45. Thakur M.K., Kulkarni S.S., Mohanty N., Kadam N.N., Swain N.S. Standardization and development of rat model with iron deficiency anaemia utilising commercial available iron deficient food. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2019, 16(1): 71 (doi: 10.13005/bbra/2722).
 46. Reeves P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(5): 838S-841S (doi: 10.1093/jn/127.5.838S).
 47. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 1993, 123(11): 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939).
 48. Joshi T.P., Fiorotto M.L. Variation in AIN-93G/M diets across different commercial manufacturers: not all AIN-93 diets are created equal. *The Journal of Nutrition*, 2021, 151(11): 3271-3275 (doi: 10.1093/jn/nxab274).
 49. Shchukina E.S., Kosovskiy G.Yu., Glazko V.I., Kashapova I.S., Glazko T.T. Domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus* var. *domestica* L. as a model in the study of domestication and biomedical researches (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2020, 55(4): 643-658 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.4.643rus).
 50. Loenko N.N. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*, 2012, 4: 17-18 (in Russ.).
 51. Cybulski W., Jarosz L., Chałabis-Mazurek A., Jakubczak A., Kostro K., Kurska K. Contents of zinc, copper, chromium and manganese in silver foxes according to their age and mineral supplementation. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2009, 12(3): 339-245.
 52. Berezina O.V. *Sravnitel'naya effektivnost' preparatov pri zhelezodefitsitnoy anemii norok. Avtoreferat kandidatskoy dissertatsii* [Comparative efficacy of drugs in iron deficiency anemia of mink. PhD Thesis]. Kazan', 2000 (in Russ.).
 53. Ender F., Dishington I., Madsen R., Helgebostad A. Iron-deficiency anemia in mink fed raw marine fish. A five year study. *Fortschr. Tierphysiol. Tierernahr.*, 1972, 2: 1-46.
 54. Mezhdunarodnye rekomendatsii po provedeniyu mediko-biologicheskikh issledovaniy s ispol'zovaniem zhivotnykh. *Lanimalogiya*, 1993, 1: 29 (in Russ.).
 55. Abrashova T.V., Gushchin Ya.A., Kovaleva M.A., Rybakova A.V., Selezneva A.I., Sokolova A.P., Khod'ko S.V. *Spravochnik. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nykh zhivotnykh* [Guide. Physiological, biochemical, and biometric indicators of the norm of experimental animals]. Moscow, 2013 (in Russ.).
 56. Bityukov I.P., Lysov V.F., Safonov N.A. *Praktikum po fiziologii sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh* [Workshop on the physiology of farm animals]. Moscow, 1990 (in Russ.).
 57. Todorov I.N., Todorov G.I. *Stress, starenie i ikh biokhimicheskaya korrektsiya* [Stress, aging and their biochemical correction]. Moscow, 2003 (in Russ.).
 58. Kamyshnikov V.S. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics]. Moscow, 2022 (in Russ.).
 59. Rydal M.P., Bhattarai S., Nielsen J.P. An experimental model for iron deficiency anemia in sows and offspring induced by blood removal during gestation. *Animals (Basel)*, 2021, 11(10): 2848 (doi: 10.3390/ani11102848).
 60. Krasnikova I.M. *Patogeneticheski obosnovannye printsipy korrektsii eksperimental'nykh zhelezodefitsitnykh anemiy. Kandidatskaya dissertatsiya* [Pathogenetic principles of correction of experimental iron deficiency anemia. PhD Thesis]. Irkutsk, 2003 (in Russ.).

61. Krasnikova I.M., Chetverikova T.D., Kuklina L.B., Kolbaseeva O.V., Makarova N.G., Noskova L.K., Medvedeva S.A., Aleksandrova G.P., Grishchenko A.A. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, 2002, 31(2): 26-27 (in Russ.).
62. Zhang A.S., Canonne-Hergaux F., Gruenheid S., Gros P., Ponka P. Use of Nramp2-transfected Chinese hamster ovary cells and reticulocytes from mk/mk mice to study iron transport mechanisms. *Exp. Hematol.*, 2008, 36(10): 1227-1235 (doi: 10.1016/j.exphem.2008.04.014).
63. Hunt A., Jugan M.C. Anemia, iron deficiency, and cobalamin deficiency in cats with chronic gastrointestinal disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2021, 35(1): 172-178 (doi: 10.1111/jvim.15962).
64. Antipov A.A. *Patogeneticheskie mekhanizmy razvitiya, diagnostika i profilaktika alimentarnoy zhelezodefitsitnoy anemii porosyat. Kandidatskaya dissertatsiya* [Pathogenetic mechanisms of development, diagnosis and prevention of alimentary iron deficiency anemia of piglets. PhD Thesis]. Moscow, 2013 (in Russ.).
65. Zoller H. Duodenal metal-transporter (DMT-1, Nramp-2) expression in patients with hereditary haemochromatosis. *Lancet*, 1999, 353: 2120 (doi: 10.1016/S0140-6736(98)11179-0).
66. Kang J.O. Chronic iron overload and toxicity: clinical chemistry perspective. *Clinical and Laboratory Science*, 2001, 14(3): 209-219.
67. Lukina E.A., Dezhenkova A.V. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika*, 2015, 8(4): 355-361 (in Russ.).
68. Salomao M.A. Pathology of hepatic iron overload. *Clin. Liver Dis. (Hoboken)*, 2021, 17(4): 232-237 (doi: 10.1002/cld.1051).