

# БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 615.356.032.065.076.9

## ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ НА ПРОЯВЛЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У ПОТОМСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*Е.А. Зенкова\*, П.А. Кулеш, А.А. Багаева*

*Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Россия*

## INFLUENCE OF PRENATAL INTRODUCTION OF VITAMIN COMPLEX ON MANIFESTATION OF ALLERGIC REACTIONS IN POSTERITY OF EXPERIMENTAL ANIMALS

*E.A. Zenkova\*, P.A. Kulesh, A.A. Bagaeva*

*Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation*

**Цель.** Оценка влияния пренатального введения поливитаминных комплексов экспериментальным животным на развитие аллергических реакций у потомства.

**Материалы и методы.** Половозрелых самок ссаживали с самцами 1:3 и при наступлении беременности на протяжении всего периода вводили комплексы витаминов в терапевтической дозе ( $n = 8$ ) и пятикратно увеличенной ( $n = 8$ ). Контрольной группе самок вводили воду очищенную. По достижении потомством возраста 1 месяца проводили забор крови и постановку аллергических реакций, для чего группа потомства от самок, получавших терапевтическую дозу витаминов, была разделена на группу, сенсибилизированную витаминами в течение 7 дней, и группу, не принимавшую витамины. Аналогично было разделено потомство от самок, получавших пятикратную дозу витаминов, и потомство от контрольной группы. Выраженность аллергических реакций оценивали в тесте гиперчувствительности замедленного типа с использованием полного адьюванта Фрейнда и в тесте дегрануляции тучных клеток. Кроме того, проводили подсчет лейкоформулы в мазках периферической крови и рассчитывали массовые коэффициенты иммунокомпетентных органов после эвтаназии части животных из всех групп.

**Результаты.** У потомства, полученного от самок, принимавших в течение беременности пятикратную дозу витаминов, было отмечено усиление аллергической реакции замедленного типа в 1,7–3,0 раза в сравнении с контрольными группами, при этом сенсибилизация данного потомства витаминами в течение 7 дней перорально снизила проявление реакции. Тем не менее статистически значимо были превышены показатели контрольных групп и групп животных от самок, получавших в течение бере-

© Зенкова Е.А., Кулеш П.А., Багаева А.А., 2017

тел. +7 922 649 72 75

e-mail: EAZenkova@mail.ru

[Зенкова Е.А. (\*контактное лицо) – старший преподаватель кафедры фармакологии, аспирант кафедры фармакологии; Кулеш П.А. – студент V курса лечебного факультета; Багаева А.А. – студент IV курса лечебного факультета].

менности терапевтические дозы витаминов, проявления реакции гиперчувствительности замедленного типа в которых были практически сопоставимы. В реакции немедленного типа было установлено статистически значимое превышение показателя дегрануляции тучных клеток во всех экспериментальных группах в 2–2,5 раза в сравнении с контрольными группами, при этом показатели дегрануляции тучных клеток в группах животных, сенсibilизированных перорально в течение 7 дней, были достоверно выше в 1,4 раза, чем в группах потомства, не получавших витамины.

В обеих группах несенсibilизированного потомства было отмечено уменьшение массового коэффициента селезенки. Влияния на лейкоцитарную формулу периферической крови потомства во всех экспериментальных группах не обнаружено.

**Выводы.** Пренатальное введение самкам крыс комплексов витаминов изменяет проявления у потомства аллергических реакций как немедленного, так и замедленного типов, причем введение потомству, полученному от указанных самок, витаминов в течение 7 дней также неоднозначно влияет на течение аллергических реакций.

**Ключевые слова.** Витаминные комплексы, белые крысы, потомство, аллергическая реакция замедленного типа, реакция дегрануляции тучных клеток, лейкоформула.

**Aim.** To estimate the influence of prenatal introduction of polyvitamin complexes to experimental animals on the development of allergic reactions in their posterity.

**Materials and methods.** Sexually mature female rats were placed with males 1:3 and during all the period of pregnancy they received vitamin complexes in the therapeutic dose (ITD) ( $n = 8$ ) and a five-fold greater dose (5TD) ( $n = 8$ ). The control female rats received treated water. By the age of 1 month, the posterity underwent blood sampling and allergic tests. For this purpose, the group of posterity from females, receiving therapeutic dose of vitamins was divided into 2 groups: the group, sensitized with vitamins during 7 days and the group without vitamins. Similarly was divided the posterity from females, receiving a five-fold dose of vitamins, and the posterity from control animals. Manifestation of allergic reactions was assessed in hypersensitivity test of delayed type using a full Freund's adjuvant and mast cell degranulation test. Besides, leukogram in peripheral blood smears was calculated and mass coefficients of immunocompetent organs after euthanasia of a part of animals from all the groups were estimated.

**Results.** In the posterity from female rats, receiving a five-fold dose of vitamins during pregnancy, strengthening of a delayed type allergic reaction by 1.7-3 times compared to the control groups was stated. At the same time, peroral sensibilization of this posterity with vitamins during 7 days reduced the manifestation of this reaction, though, statistically significantly exceeding the indices of control groups and animal groups from females, taking during pregnancy therapeutic doses of vitamins, with practically comparable manifestations of delayed type hypersensitivity reactions. In the reaction of immediate type, a statistically significant 2-2.5 times excess of mast cell degranulation index in all experimental groups compared to the control groups was established. At the same time, mast cell degranulation indices in the animal groups, perorally sensibilized during 7 days, was reliably higher (by 1.4 times) than in the groups of posterity without vitamin intake. In both groups of nonsensibilized posterity decrease in mass coefficient of the spleen was noted. No influence on the posterity peripheral blood leukogram in all experimental groups was detected.

**Conclusions.** Prenatal introduction of vitamin complexes to female rats alters manifestations of allergic reactions of both immediate and delayed type in the posterity; introduction of vitamins to the posterity from the above mentioned female rats during 7 days also ambiguously influences the course of allergic reactions.

**Key words.** Vitamin complexes, white rats, posterity, delayed type allergic reaction, mast cell degranulation reaction, leukogram.

## ВВЕДЕНИЕ

Назначение комплексных витаминных препаратов беременным является общемировой практикой [6, 7]. Данные о зависимо-

сти аллергических реакций от приема витаминов достаточно противоречивы. Так, в ряде исследований доказана связь между пищевой аллергией и уровнем витамина Д [6], в других исследованиях корреляции ме-

жду проявлением аллергического ринита и приемом витамина Д во время беременности не установлено [5].

*Целью* данной работы явилась оценка влияния пренатального введения поливитаминных комплексов экспериментальным животным на развитие аллергических реакций у потомства.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе были использованы половозрелые самки белых нелинейных крыс средней массой  $231,6 \pm 17,5$  г, которые ссаживались с самцами 1:3. При наступлении беременности самки были поделены на две группы. Самкам первой группы перорально вводился комплекс витаминов в терапевтической дозе (1-я группа, ТД), второй – в 5-кратной дозе (2-я группа, 5ТД) в пересчете на крыс согласно общепринятым коэффициентам [4] на протяжении всего периода беременности (28–30 дней). В состав комплексного витаминного препарата входили витамин С (120 мг), витамин РР (20 мг), витамин Е (30 мг), фолиевая кислота (0,8 мг) и т.д. Всего более 20 компонентов, включая микроэлементы селен, хром. Контрольные животные получали воду очищенную в эквивалентных количествах.

Потомство от самок, получавших терапевтическую дозу витаминов, было разделено на две группы: группа животных, sensibilizированных перорально аналогичными дозами витаминов в течение 7 дней ( $n = 8$ ), и группа животных, не принимавших витамины после рождения ( $n = 8$ ). Аналогично

было разделено потомство от самок, получавших пятикратную дозу витаминов (две группы по 8 животных). Контрольные животные также были разделены на две группы: группа интактного контроля ( $n = 8$ ) и животные контрольной группы, sensibilizированные перорально терапевтической дозой витаминов в течение 7 дней ( $n = 8$ ).

Аллергические реакции были оценены в тесте гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и в тесте дегрануляции тучных клеток по стандартным методикам [3]. Кроме того, была изучена лейкоцитарная формула путем микроскопирования мазка периферической крови [1]. Постановку аллергических реакций и взятие крови на анализ для оценки количественного содержания лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов проводили по достижении потомством возраста 1 месяц, что соответствует 5-летнему возрасту человека [3]. Часть животных в каждой группе была подвергнута эвтаназии с последующим забором внутренних иммунокомпетентных органов, у которых были рассчитаны массовые коэффициенты по общепринятой формуле [2].

Для постановки реакции ГЗТ крысят sensibilizировали путем однократного подкожного введения в основание хвоста суспензии поливитаминных комплексов в терапевтической дозе (1ТД) и пятикратно увеличенной терапевтической дозе (5ТД) в полном адьюванте Фрейнда. Развитие реакции ГЗТ индуцировали введением в подушечку задней лапы раствора соответствующей дозы препарата в растворе Хенкса спустя 5 дней. Реакцию оценивали онкометрически по изменению объема лап через 6 и 24 часа. Полученные резуль-

таты сравнивали с показателями контрольной группы и между собой с использованием *t*-критерия Стьюдента. Отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

При постановке реакции непрямого дегрануляции тучных клеток крыс подвергали эвтаназии, вводили внутривенно 5 мл подогретого до 37 °С раствора Тироде без глюкозы, после легкого массажа брюшной стенки в течение 1–1,5 мин производили ножницами разрез по средней линии длиной 1,5–2 см, переворачивали тушку вниз и собирали экссудат, стекающий с петель кишечника в смоченную гепарином пробирку. Препараты готовили на обезжиренных предметных стеклах, окрашенных 0,3%-ным спиртовым раствором нейтрального красного и высушенных при комнатной температуре.

К 0,03 мл взвеси тучных клеток добавляли 0,03 мл сыворотки полученного препарата животного и 0,03 мл специфического аллергена (исследуемой дозы витамина в разведении 1:100). Оценку результатов проводили дифференциальным способом учета, подсчитывая показатель дегрануляции тучных клеток (ПДТК) по формуле

$$\text{ПДТК} = \frac{1a + 2b + 3c + 3d}{100},$$

где *a*, *b*, *c*, *d* – количество (среднее из трех повторений) дегранулированных клеток соответственно степени дегрануляции (слабовыраженной, умеренной, резкой и степени полностью дегранулированных клеток). В каждой камере подсчитывали 100 клеток.

Кроме того, был рассчитан массовый коэффициент иммунокомпетентных органов, для чего у части животных, подвержен-

ных эвтаназии, были извлечены и взвешены тимус и селезенка.

Анализ периферической крови проводили путем подсчета агранулоцитов и гранулоцитов в мазке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Реакция гиперчувствительности замедленного типа.** В тесте постановки реакции ГЗТ средний процент прироста объема лап животных в группе потомства, полученного от группы животных, принимавших витамины в терапевтической дозе, достоверно не отличался от контрольной группы, в равной степени как у сенсibilизированных, так и несенсibilизированных крыс (табл. 1). Так, для несенсibilизированных животных, полученных от самок, которым вводили витамины в дозе 1ТД, прирост составил  $41,3 \pm 16,2 \%$ , в контрольной группе животных от интактных самок объем лапы изменился на  $35,2 \pm 13,5 \%$ . Схожие значения были получены в группах крыс, сенсibilизированных перорально в течение 7 дней:  $37,6 \pm 13,6 \%$  составил прирост в экспериментальной группе 1ТД, и  $35,2 \pm 12,9 \%$  – в контрольной. Динамика уменьшения отека также была сопоставима в группах 1ТД как сенсibilизированного, так и несенсibilизированного потомства (снижение объема лапы на  $14,8 \pm 5,3$  и  $15,2 \pm 4,7 \%$  соответственно) и схожа с показателями контрольной группы, получавшей витамины. В контрольной группе животных, оставшихся интактными отмечено полное отсутствие аллергической реакции спустя 24 часа от начала эксперимента.

Существенные отличия были обнаружены в группах, получавших дозу 5ТД. Реакция в группе несенсибилизированного потомства была в 3 раза больше (прирост объема лапы на  $108,4 \pm 31,9$  %) в сравнении с контрольной группой как сенсибилизированного, так и несенсибилизированного потомства. При этом реакция в группе потомства от самок, получавших дозу 5ТД, сенсибилизированного витаминами в течение 7 дней, была также достоверно больше и превышала значения контрольных групп в 1,7 раза. Снижение отека и проявления аллергической реакции в группе несенсибилизированного потомства были практически сопоставимы с контрольными группами. В группе потомства, получавшей

витамины, процент уменьшения отека через 24 часа был в 2 раза больше, чем у животных контрольной группы, получавшей витамин (35,3 ± 6,4 и 18,3 ± 4,9 % соответственно).

Обращают на себя внимание отличия в контрольных группах животных. При совпадении выраженности отека и, соответственно, проявлении аллергической реакции спустя 6 часов была обнаружена статистически значимая разница в динамике снижения отека, в частности процент уменьшения объема лапы в группе не получавших витамин животных был в 1,7 выше, чем в группе сенсибилизированных животных, и полученные значения через 24 часа практически совпадали с фоновыми данными (см. табл. 1).

Таблица 1

**Влияние пренатального введения комплекса витаминов в терапевтической и пятикратно увеличенной дозе на результаты теста замедленной гиперчувствительности у потомства белых крыс**

Группа потомства	Сенсибилизированные 7 дней перорально			Несенсибилизированные		
	прирост объема лапы, %		уменьшение объема, %	прирост объема лапы, %		уменьшение объема, %
	через 6 часов	через 24 часа		через 6 часов	через 24 часа	
1-я (ТД)	37,6 ± 13,6	22,9 ± 5,6	14,8 ± 5,3	41,3 ± 16,2	26,0 ± 13,9 <sup>#</sup>	15,2 ± 4,7 <sup>#</sup>
2-я (5ТД)	59,2 ± 21,2 <sup>*#</sup>	23,9 ± 13,1	35,3 ± 6,4 <sup>*</sup>	108,4 ± 31,9 <sup>*#</sup>	86,4 ± 31,8 <sup>*#</sup>	22,0 ± 6,0
Контроль	35,2 ± 12,9	16,9 ± 3,9	18,3 ± 4,9 <sup>*</sup>	35,2 ± 13,5	7,4 ± 8,3	30,7 ± 8,0

Примечание: \*  $p < 0,05$  при сравнении соответствующего аналогичного параметра с параметром группы сенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  при сравнении соответствующего аналогичного параметра с показателем группы несенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента; <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с группой несенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента.

**Тест непрямой дегрануляции тучных клеток.** Для несенсибилизированного потомства показатель дегрануляции тучных клеток (ПДТК) был сопоставим в группе 1ТД и в группе 5ТД и составил соответственно  $0,51 \pm 0,10$  и  $0,44 \pm 0,05$ , превышая значения интактной контрольной группы в 2,0–2,5 раза ( $0,18 \pm 0,04$ ). Показатель дегрануляции туч-

ных клеток в экспериментальной группе потомства, получавшего перорально витамин, равный  $0,73 \pm 0,08$ , был достоверно выше контрольной группы в 2,5 раза ( $0,29 \pm 0,05$ ) и практически аналогичен группе, получавшей пятикратную дозу витаминов ( $0,62 \pm 0,13$ ). Необходимо отметить, что значение ПДТК контрольной группы, сенсибилизированной

перорально в течение 7 дней, равное  $0,29 \pm 0,05$ , было достоверно выше ПДТК контрольной группы, состоявшей из интактных животных ( $0,18 \pm 0,04$ ) (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние пренатального введения комплекса витаминов на реакцию дегрануляции тучных клеток у потомства**

Группа животных	Сенсибилизированные (7 дней перорально)	Несенсибилизированные
1ТД	$0,73 \pm 0,08^*$	$0,51 \pm 0,10^{*\#}$
5ТД	$0,62 \pm 0,13^*$	$0,44 \pm 0,05^{*\#}$
Контроль	$0,29 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,04$

Примечание: \*  $p < 0,05$  при сравнении с группой сенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента; #  $p < 0,05$  при сравнении с группой несенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента; \*  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующей сенсибилизированной группой; использован  $t$ -критерий Стьюдента.

Массовые коэффициенты (МК) иммунокомпетентных органов рассчитывали по формуле [2]

$$МК = \text{Масса органа, г} \cdot 1000 / \text{Масса тела, г}$$

Было установлено достоверное снижение массового коэффициента селезенки в группе потомства, которое не было сенсибилизировано в течение 7 дней, при сравнении с показателем контрольных групп. Отличий в массовых коэффициентах тимуса во всех экспериментальных группах не отмечено (табл. 3).

Анализ периферической крови проводился путем подсчета лейкоцитарной формулы в мазках по общепринятой методике у потомства от самок, получавших терапевтическую и пятикратную дозы витаминов. Статистически значимых изменений в коли-

честве и соотношении агранулоцитов и гранулоцитов во всех группах потомства обнаружено не было (табл. 4). Количество лимфоцитов составляло 75–85 %, нейтрофилы в пределах 15–20 %.

Таблица 3

**Массовые коэффициенты иммунокомпетентных органов потомства, полученного от самок, принимавших комплексы витаминов в терапевтической и пятикратной дозе**

Группа потомства	Сенсибилизированные		Несенсибилизированные	
	селезенка	тимус	селезенка	тимус
1ТД	$6,9 \pm 1,6$	$5,1 \pm 1,1$	$4,0 \pm 1,0^{*\#}$	$5,0 \pm 0,9$
5ТД	$7,8 \pm 1,9$	$4,2 \pm 1,2$	$4,7 \pm 1,2^{*\#}$	$4,6 \pm 0,6$
Контроль	$7,0 \pm 1,1$	$4,1 \pm 0,8$	$6,0 \pm 1,1$	$4,7 \pm 1,1$

Примечание: \*  $p < 0,05$  при сравнении с группой сенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента; #  $p < 0,05$  при сравнении с группой несенсибилизированного контроля; использован  $t$ -критерий Стьюдента.

Таблица 4

**Влияние пренатального введения витаминных комплексов на показатели лейкоцитарной формулы у потомства, %**

Показатель	Группа потомства от самок, получавших дозы витаминов		
	1ТД	5ТД	контроль
Лимфоциты	$78,2 \pm 4,8$	$84,3 \pm 7,5$	$85,7 \pm 8,3$
Нейтрофилы	$20,2 \pm 4,0$	$14,0 \pm 7,7$	$13,1 \pm 8,8$
Эозинофилы	$1,0 \pm 1,0$	$2,0 \pm 1,1$	$1,0 \pm 1,0$
Базофилы	$1,0 \pm 1,1$	$1,1 \pm 1,0$	$1,0 \pm 1,0$
Моноциты	$3,0 \pm 1,0$	$1,0 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,8$

**Выводы**

У потомства, полученного от самок, принимавших в течение беременности пятикратную дозу витаминов, было отмечено усиление аллергической реакции замедленного типа, в 1,7–3,0 раза по сравнению с контрольными группами, при этом сенси-

билизация данного потомства витаминами в течение 7 дней перорально снижала проявление реакции. Тем не менее статистически значимо были превышены показатели контрольных групп и групп животных от самок, получавших в течение беременности терапевтические дозы витаминов, проявления реакции гиперчувствительности замедленного типа в которых были практически сопоставимы.

В реакции немедленного типа было установлено статистически значимое превышение показателя дегрануляции тучных клеток во всех экспериментальных группах в 2,0–2,5 раза в сравнении с контрольными группами, при этом показатели дегрануляции тучных клеток в группах животных, сенсibilизированных перорально в течение 7 дней, были достоверно выше в 1,4 раза, чем в группах потомства, не получавших витамины.

В обеих группах несенсibilизированного потомства было отмечено уменьшение массового коэффициента селезенки.

Влияния на лейкоцитарную формулу периферической крови потомства во всех экспериментальных группах не обнаружено.

Таким образом, пренатальное введение самкам крыс комплексов витаминов изменяет проявления у потомства аллергических реакций как немедленного, так и замедленного типов, причем введение потомству, полученному от указанных самок, витаминов в течение 7 дней, также неоднозначно влияет на течение аллергических реакций.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. Под ред. А.И. Карпищенко. М.: ГЭОТАР-Медиа 2012; 1: 335–359.
2. Проблемы нормы в токсикологии. Под ред. проф. И.М. Трахтенберга. М.: Медицина 1991; 203.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К 2012; 1: 944.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина 2005; 832.
5. *Aryan Z., Rezaei N., Camargo C.A. Jr.* Vitamin D status, aeroallergen sensitization, and allergic rhinitis: A systematic review and meta-analysis. *Int Rev Immunol* 2017; 19: 1–13.
6. *Foong R.-X., Meyer R., Dziubak R., Lozinsky A., Godwin H., Reeve K., Hussain S., Nourzaie R., Shab N.* Establishing the prevalence of low vitamin D in non-immunoglobulin-E mediated gastrointestinal food allergic children in a tertiary centre. *World Allergy Organ J* 2017; 10 (1): 4.
7. *Masbo S.* Pre-pregnancy obesity and non-adherence to multivitamin use: findings from the National Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (2009–2011). *BMC Pregnancy Childbirth* 2016; 16: 210.
8. *Morisset A.* Rankings of iron, vitamin D, and calcium intakes in relation to maternal characteristics of pregnant Canadian women. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016; 41 (7): 749–757.

Материал поступил в редакцию 12.08.2017