АНАЛІЗ ВПЛИВУ IN VITRO ЩАВЛЄВОЇ КИСЛОТИ НА АКТИВНІСТЬ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ НИРОК БІЛИХ ЩУРІВ В ОНТОГЕНЕЗІ

К.Н. Хлус, Л.Н. Хлус

Щавлева кислота і її солі - оксалати - є широко розповсюдженими в природних об'єктах органічними речовинами. Протягом всього життя внаслідок споживання великої кількості багатих на них продуктів людина випробовує потужний оксалатний пресинг, що веде до появи різноманітних патологій, найбільш відомий з яких кальційоксалатний літогенез (James, 1972). У той же час багато аспектів розвитку несприятливих оксалатіндукованих процесів, особливо на молекулярному рівні організації живої матерії, залишаються нерозкритими.

У зв'язку із цим було почато дане дослідження, метою якого було встановлення характеру та ступеня інгібуючого впливу in vitro щавлевої кислоти на активність одного із провідних ферментів енергетичного метаболізму - лактат: NAD+ оксидоредуктазы (лактатдегидрогеназа, ЛДГ, КФ 1.1.1.27).

У без'ядерних гомогенатах тканини нирок білих щурів (n=12) відомими методами (Методи біохімічних досліджень, 1982) визначали активність ЛДГ (по зворотній реакції відновлення піровиноградної кислоти в молочну) за відсутності та присутності щавлевої кислоти в 3-х різних кінцевих концентраціях - 0,1; 0,25 і 0,5 ммоль/л. Щавлеву кислоту вводили в реакційне середовище за 5 хв до ініціації реакції. Розраховували ступінь інгібування

ферменту (в %), а подальша математична обробка даних здійснювалася відомими методами варіаційної статистики (Афифи А., Эйзен С., 1982) із застосуванням комп'ютерних програм NCSS 2000 і Statgraphics Plus 3.0.

Проведений на першому етапі кореляційний аналіз виявив досить високий рівень дозозалежності зниження активності ЛДГ під впливом щавлевої кислоти: параметричний коефіцієнт кореляції r склав 0,8158±0,1829 (Fф=19,90; P=0,0012), а непараметричний коефіцієнт кореляції рангів за Спірменом дорівнював 0,8278. Оскільки в наявності істотне відхилення зазначеної залежності від лінійності, на другому етапі математичного аналізу вирішувалося завдання визначення найбільш адекватного характеру залежності ступеня інгібування ЛДГ (залежної змінної Y) від концентрації щавлевої кислоти (незалежної змінної X), для чого було проведене порівняння альтернативних моделей з використанням методу регресійного аналізу. Оцінка 12 моделей за величиною R-квадратів (зведеного у квадрат коефіцієнта кореляції) дозволила виділити 5 моделей, кожна з яких не менш, ніж на дві третини, пояснювала спостережуваної мінливості залежної змінної. Аналіз їхніх характеристик, наведених у табл. 1, дозволив зробити висновок, що найбільш точними є рівняння 1-3: поліноміальне рівняння параболи 2-го порядку, логарифмічне рівняння й рівняння залежності від квадратного кореня незалежної змінної, а рівняння 4-5, що демонструють реципрокну (гіпербола 1-го порядку) і лінійну регресії, трохи поступаються попереднім моделям у точності.

Таблиця 1.

Параметри зв'язку між ступенем інгібування ЛДГ і концентрацією щавлевої кислоти залежно від типу регресії

№	Тип регресії	Модель	r	R-квадрат, %
1	$Y=a+b*X+c*X^2$	$Y=-2,027+254,713*-234,417*X^2$	0,8362	69,923
2	Y=a+b*lnX	Y=86,343+28,344*lnX	0,8362	69,923
3	Y=a+b*√X	Y=-14,099+116,272*√X	0,8309	69,043
4	Y=a+b/X	Y=73,652-5,388/X	-0,819	67,079
5	Y=a+b*X	Y=13,641+110,475*X	0,8158	66,553

Подальший аналіз трьох перших рівнянь дав можливість вибрати одне з них, що найбільше адекватно описує існуючу взаємозалежність ефект/доза. З даних таблиці 2 видно, що жодна константа або коефіцієнт, що входять до складу рівняння поліноміальної регресії, не досягали достовірних значень (навіть на рівні $P \leq 0,1$) через високі значення стандартних помилок. У рівнянні корінної регресії невірогідним виявився параметр а, і тільки рівняння логарифмічної залежності складалося з елементів з абсолютно достовірними величинами (на 3-му рівні значущості, $P<0,001$).

Визначення асимптотичних кореляцій між параметрами різних рівнянь регресії (табл. 3) виявило у двох випадках (для пропонованих рівнянь поліноміальної і корінної регресій) перевищення граничного значення, рівного 0,95. Це означає, що точність оцінки даних параметрів є сумнівною, і перевагу варто віддати рівнянню логарифмічної залежності.

Таблиця 2.

Показники вірогідності параметрів пропонованих регресійних рівнянь

Параметр рівняння	Тип регресії	Стандартна помилка	t-критерій	P
a	$Y=a+b*X+c*X^2$	17,59	-0,115	0,911
	$Y=a+b*\ln X$	9,42	9,165	0,0
	$Y=a+b*\sqrt{X}$	13,11	4,723	0,307
b	$Y=a+b*X+c*X^2$	145,76	1,747	0,115
	$Y=a+b*\ln X$	5,88	4,822	0,0007
	$Y=a+b*\sqrt{X}$	24,62	4,723	0,0008
c	$Y=a+b*X+c*X^2$	233,45	-1,004	0,342
	$Y=a+b*\ln X$	-	-	-
	$Y=a+b*\sqrt{X}$	-	-	-

Таблиця 3.

Асимптотичні кореляції між параметрами рівнянь регресії

Тип регресії	Корелюючі параметри рівнянь		
	a-b	a-c	b-c
$Y=a+b*X+c*X^2$	-0,942	0,887	-0,985*
$Y=a+b*\ln X$	0,911	-	-
$Y=a+b*\sqrt{X}$	-0,954*	-	-

Примітка: * - точність оцінки даних параметрів сумнівна

На заключному етапі аналізу даних з метою оцінки сили й вірогідності дозозалежних ефектів щавлевої кислоти на активність ЛДГ використали метод однофакторного дисперсійного аналізу. Первинні дані були згруповані у вигляді комбінаційної таблиці, у якій налічувалося по 4 варіанти в кожній з

3-х градацій (концентрацій щавлевої кислоти - 0,1; 0,25 і 0,5 ммоль/л) організованого фактора А, тобто ступеня інгібування ЛДГ щавлевою кислотою. Для кожної моделі регресійної залежності здійснювали аналіз одержаних дисперсійних комплексів з розрахунком: 1) факторіальної D_A, випадкової, або залишкової D_e і загальної D_Y девіат (сум квадратів відхилень); 2) відповідних вибіркових дисперсій (середніх квадратів відхилень) A_2, e_2 і Y_2; 3) чисел ступенів вольності k, k_e і k; 4) показника сили впливу фактора з помилкою $\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$; 5) емпіричного значення F-критерію Фішера F_ϕ; 6) імовірності помилкової оцінки Р. Знаходили групові середні ($x_{0,1}$, $x_{0,25}$ і $x_{0,5}$) (з помилками) інгібування ферментативної активності по кожній градації, а також так званий ефект, тобто різницю між окремими груповими середніми і загальною середньою. Вірогідність різниці між груповими середніми оцінювали з використанням семи різних тестів множинного порівняння, що використовують як помилку різниці корінь квадратний з відношення σ_e^2 до загального числа варіант, найбільш відомим з яких є тест Тьюкі-Крамера.

Виявлено сильний інгібуючий ефект щавлевої кислоти на лактатдегідрогеназу нирок (табл. 4). Середнє зниження її активності склало близько 45%, при цьому воно виражено зростало зі збільшенням концентрації діючої речовини від 21,1% до 66,73%.

Таблиця 4.

Характеристика групових середніх

Статистичний параметр, одиниця	Концентрація, ммоль/л			Загальна
	0,1	0,25	0,5	
Групова середня, %	21,10	47,0	66,73	44,94
Кількість варіант	4	4	4	12
Помилка середньої	7,075	7,075	7,075	-
Ефект	-23,842	2,058	21,783	-

Використання тестів множинного порівняння групових середніх демонструє вірогідність різниці між дією двох крайніх із трьох використаних концентрацій щавлевої кислоти, а три тести (Дункана, Фішера й Ньюмана-Кеулса) підтверджують також різницю в ефектах концентрацій 0,1 і 0,25 ммоль/л (табл. 5).

Таблиця 5.

Тести множинного порівняння групових середніх.

Тести	Концентрація, ммоль/л		
	0,1	0,25	0,5
Бонферроні (парний)	0,5	-	0,1
Бонферроні (з контролем)	0,5	-	0,1
Дункана	0,25; 0	0,1	0,1
Фішера	0,25; 0,5	0,1	0,1
Ньюмана-Кеулса	0,25; 0,5	0,1	0,1
Шеффе	0,5	-	0,1
Тьюкі-Крамера	0,5	-	0,1

Примітка: зазначені концентрації, з якими існує достовірна різниця при =5%

Однофакторний дисперсійний аналіз для трьох обраних рівнянь регресійних залежностей доводить вірогідність впливу щавлевої кислоти на активність ЛДГ (табл. 6-8). У всіх випадках факторіальні девіати D_A, що характеризують міжгрупове варіювання стосовно діючого фактора, значно перевищують залишкові девіати De, що свідчать про рівень внутрішньогрупової мінливості. У результаті для регресії $Y=a+b*X+c*X^2$ емпіричний критерій Фішера $F_ф$ вище F_{st} на 1-му рівні значимості (P = 0,05), а для інших регресій - на 3-му рівні (P = 0,001). Це означає, що розмаїтість групових середніх у дисперсійному комплексі не може бути пояснена тільки випадковими впливами, а визначається в основному дією досліджуваного фактора. Даний висновок додатково підтверджується відповідними значеннями ймовірності помилкового заперечення нульової гіпотези P.

Таблиця 6.

Результати дисперсійного аналізу для регресійної моделі $Y=a+b*X+c*X^2$

Варіація	D	k	σ^2	$F_ф$	F_{st} для рівня значущості α		
					5 %	1 %	0,1%
Факторна	4188,70	2	2094,35	0,46*	4,26	8,02	16,4
Випадкова	1801,77	9	200,20	-			
Загальна	5990,47	11	544,59	-			
P	0,0045*						
$\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$	0,699±0,0668						

Примітка: * - вплив фактора вірогідний

Таблиця 7.

Результати дисперсійного аналізу для регресійної моделі Y=a+b*lnX

Варіація	D	k		$F_ф$	F_{st} для рівня значущості α		
					5%	1%	0,1%
Факторна	4188,69	1	4188,69	23,3*	4,96	10,04	21,0
Випадкова	1801,78	10	180,178	-			
Загальна	5990,47	11	544,59	-			
P	0,0007*						
$\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$	0,699±0,0668						

Примітка: * - вплив фактора вірогідно

Таблиця 8.

Результати дисперсійного аналізу для регресійної моделі Y=a+b*√X

Варіація	D	k	σ	$F_ф$	F_{st} для рівня значущості α		
					5%	1%	0,1%
Факторна	4135,97	1	4135,97	22,3*	4,96	10,04	21,0
Випадкова	1854,50	10	185,45	-			
Загальна	5990,47	11	544,59	-			
P	0,0008*						
$\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$	0,690±0,0688						

Примітка: * - вплив фактора вірогіднbq

Таким чином, у результаті проведеного дослідження продемонстроване значне оксалатзалежне пригнічення лактатдегідрогеназної активності в

нирках білих щурів. Виявлений ефект характеризується вираженої дозо залежністю в інтервалі концентрацій щавлевої кислоти від 0,1 до 0,5 ммоль/л, причому її вплив вірогідно пояснює до 70% всієї мінливості активності ЛДГ на 3-му рівні значущості. Найбільше точно цей зв'язок описується рівнянням логарифмічної регресії Y=a+b*lnX.

Библиографический список

Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ: Подход с использованием ЭВМ. – М.: Мир, 1982. – 488 с.

Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд. Ленинградского университета, 1982. – 272 с.

JamesL.F. Oxalate toxicosis // Clin. Toxicol. –1972. – 5, № 2. – P. 231-243.