

РОЛЬ ЩАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ В РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ТВАРИН

К.М.Хлус

Буковинська державна медична академія, м. Чернівці

Досліджено *in vitro* вплив екзогенної щавлевої кислоти на активність малатдегідрогенази печінки та скелетних м'язів щурів. Визначено параметри залежності ступеня оксалатіндукованого пригнічення малатдегідрогеназної реакції від віку тварин, концентрації діючої сполуки та типу органу.

Ключові слова: щавлева кислота, оксалати, малатдегідрогеназа, інгібування, печінка, скелетні м'язи.

Вступ. Метаболізм і властивості щавлевої кислоти та її солей – поширених компонентів тканин вищих і нижчих рослин, грибів, тваринних тканин, органів і біорідин – тривалий час досліджуються з медичної точки зору [4]. Здавна відомі випадки летальних і сублетальних отруєнь сільськогосподарських тварин запліснявленими кормами, які містять значну кількість щавлевої кислоти, синтезованої грибами *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, а також оксалатпродукуючими вищими рослинами *Halogeton glomeratus*, *Setaria sphacellata*, *Oxalis pes-caprae*, *Amaranthus retroflexus*, *Cenchrus ciliaris* [4]. Основні ознаки отруєння - швидке та важке дихання, депресія, дискоординація, порушення локомоції при пересуванні на значні відстані, часто конвульсії та судоми, кволість, кома; серед морфологічних змін – збільшена та зблідла печінка, дифузне запалення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту з пухирями та численними кровотечами, різноманітні ураження нирок тощо; часто настає смерть.

Гострі та хронічні оксалатні інтоксикації людей траплялися при надмірному споживанні листя ревеню і квасениці, спробах суїциду, тривалому контакті з оксалатвмісними композиціями на виробництві тощо. Показана небезпека погіршення стану здоров'я при зловживанні звичайними продуктами харчування з високою концентрацією сполук щавлевокислотного ряду (чай, кава, какао, шоколад, шпинат, арахіс) [2, 4].

Провідними ефектами при оксалозах вважаються гіпокальціємія, гіпотонія, кальційоксалатний уролітіаз і нефрокальціноз, ураження сечоутворюючої та іонорегулюючої функцій нирок. Проте досі залишаються нез'ясованими механізми впливу оксалатів на енергетичний метаболізм, в тому числі на активність його ключових ферментів, зокрема, NAD-малатдегідрогенази (*L*-малат: NAD⁺ оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.37, МДГ), хоча відомі приклади її інгібування іншими карбоновими кислотами (цитратом, лактатом, оксалоацетатом, α -кетоглутаратом), що використовується, перш за все, для гнучкої регуляції інтенсивності обміну речовин та енергії

[5].

МДГ відіграє надзвичайно важливу поліфункціональну роль у тканинах тварин, забезпечуючи активне функціонування цитрат-піруватного циклу і циклу трикарбонових кислот, регуляцію співвідношення окислених і відновлених форм NAD через участь у роботі малат-аспартатного “човникового” механізму і т.д. Це обумовлює істотне науково-практичне значення вивчення оксалатіндукованих змін активності даного фермента.

Матеріал і методи. Предмет дослідження: без'ядерні гомогенати печінки та скелетних м'язів (органів з переважно анаеробним типом метаболізму) білих щурів двох вікових груп (6 і 12 місяців). Об'єкт дослідження: вплив *in vitro* щавлевої кислоти (в кінцевих концентраціях 2 і 2,5 ммоль/л) на активність МДГ, визначення якої здійснювали кінетичним методом за збільшенням вмісту NADH в реакції взаємодії *L*-малату та NAD⁺ [1]. Зростання оптичної густини реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 у кюветах на 1 см при 340 нм протягом 1-2 хв. Розчин щавлевої кислоти вносили до системи за 5 хв. до ініціації реакції розчином NAD.

При аналізі даних використовували комп'ютерні пакети математико-статистичних програм NCSS 2000, Statistica v.5.5A і Statgraphics Plus 3.0. Після обчислення результативної ознаки Y – ступеня оксалатіндукованого зниження інтенсивності МДГ-реакції (в %) – виявляли її залежність від концентрації діючої речовини та віку тварин за коефіцієнтами кореляції: параметричної за Пірсоном з помилкою $r \pm S_r$, непараметричної за Спірменом r_s і множинної $r_{X(AB)}$ [3].

Виводили відповідні рівняння лінійної регресії; правильність вибору корелятивно-регресивних залежностей підтверджували їх дисперсійним аналізом за величиною *F*-критерію, внесок обраних регресивних моделей у пояснення варіабельності результативної ознаки оцінювали за коефіцієнтами детермінації (*R*-квадрат). Значущість коефіцієнтів кореляції та регресії перевіряли за *t*-критерієм Ст'юдента, а нормальність розподілу варіант – за коефіцієнтами асиметрії A_s та ексцесу E_x .

Комбінаційну таблицю первинних даних використовували для формування єдиного рівномірного ($n=4$) статистичного комплексу, який піддавали трифакторному дисперсійному аналізу. Визначали характер залежності пригнічення МДГ від величини 3-х регульованих у досліді факторів (фактор *A* – діюча концентрація щавлевої кислоти; *B* – вік тварин; *C* – тип органу), а також ефекти їх поєднаної дії. Розраховували: 1) дев'яти - факторіальні $D_A, D_B, D_C, D_{AB}, D_{AC}, D_{BC}, D_{ABC}$; випадкову, або залишкову D_E і спільну D_Y ; 2) відповідні вибіркові дисперсії (середні квадрати відхилень) σ^2 ; 3) відповідні ступені свободи k ; 4) показники сили впливу факторів η^2 ; 5) емпіричні значення *F*-критерію Фішера F_ϕ .

Обчислювали групові середні зі стандартними помилками $y \pm S_y$ по кожній градації комплексу. Достовірність різниці між груповими середніми

оцінювали із застосуванням тестів множинного порівняння (перевагу віддавали методу Тьюкі).

Результати досліджень. Первинні результати дослідження представлені в комбінаційній таблиці (табл. 1).

Таблиця 1.

Комбінаційна таблиця первинних даних.

| Градації вказаних факторів | | | Ступень пригнічення МДГ-реакції, % | | | |
|----------------------------|---------------|---------|------------------------------------|-------|-------|-------|
| A, ммоль/л | B, місяців | C | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2 | 6 | печінка | 10,71 | 8,19 | 16,03 | 14,16 |
| | | м'язи | 21,87 | 5,18 | 20,34 | 18,35 |
| | 12 | печінка | 4,79 | 5,42 | 2,13 | 0,87 |
| | | м'язи | 4,08 | 1,11 | 0,0 | 0,91 |
| 2,5 | 6 | печінка | 11,43 | 9,05 | 16,79 | 13,72 |
| | | м'язи | 28,13 | 18,96 | 18,64 | 18,35 |
| | 12 | печінка | 8,22 | 10,42 | 2,84 | 3,46 |
| | | м'язи | 22,45 | 11,11 | 8,33 | 3,64 |

Здійснений кореляційний аналіз вказує на високу вікову залежність ступеня пригнічення МДГ-реакції в печінці та скелетних м'язах за дії щавлевої кислоти: коефіцієнти кореляції (за Пірсоном) дорівнюють $-0,793 \pm 0,163$ і $-0,685 \pm 0,195$ (табл. 2). За величинами t-критерію $-4,86$ і $-3,52$ ці результати є високо достовірними відповідно на третьому ($P < 0,001$) та другому ($P < 0,01$) рівнях ймовірності. Отже, в онтогенезі відбувається виражене зниження чутливості МДГ до інгібуючої дії щавлевої кислоти. У той же час в обраному діапазоні концентрацій дозозалежність її впливу виявляє певну органну специфічність: низький зв'язок – у печінці, середньої сили – в м'язах. Поєднання дії обох факторів обумовлює високі значення (при $P < 0,001$) коефіцієнтів множинної кореляції $r_{X(AB)}$ в обох органах, близькі за абсолютними величинами.

Конкретний характер змін результативної ознаки Y в залежності від змін діючої концентрації речовини і віку експериментальних тварин описують рівняння множинної регресії без постійного члена: $Y = 8,386 \cdot A - 1,152 \cdot B$ для МДГ печінки і $Y = 13,85 \cdot A - 2,062 \cdot B$ для МДГ м'язів, при цьому показники асиметрії та ексцесу не перевищують стандартних значень ($P > 0,05$), тобто розподіл варіант близький до нормальної кривої (табл. 3). Оскільки всі визначені коефіцієнти регресії відрізняються високою вірогідністю ($P < 0,001$), а вираховані шляхом дисперсійного аналізу показники F-критерію Фішера значно перевищують критичні точки, можна вважати, що знайдені рівняння вірно відображають існуючі залежності. Згідно величин R-кв. запропоновані моделі майже повністю (на 89,97% - у печінці та на 87,64% - м'язах) пояснюють варіабельність Y.

Параметри кореляційних залежностей.

| Орган | Кореляції ступеня інгібування МДГ з відповідними факторами | | | | | | |
|---------|--|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|------|--------|
| | Концентрація щавлевої кислоти | | Вік тварин | | Концентрація щавлевої кислоти + вік тварин | | |
| | $r \pm S_r$ | r_s | $r \pm S_r$ | r_s | $r_{X(AB)}$ | t | P |
| Печінка | 0,175±0,263 t=0,66 P>0,05 | 0,190 t=0,72 P>0,05 | -0,793±0,163* t=-4,86 P<0,001 | -0,786* t=-4,76 P<0,001 | 0,812 | 5,01 | <0,001 |
| М'язи | 0,403±0,245 t=1,65 P>0,05 | 0,394 t=1,60 P>0,05 | -0,685±0,195* t=-3,52 P<0,01 | -0,624* t=-2,99 P<0,01 | 0,795 | 4,91 | <0,001 |

* - значення коефіцієнту вірогідне

Таблиця 3.

Параметри моделі множинної регресії $Y = a \cdot A + b \cdot B$.

| Орган | Рівняння | R-кв. % | F-кр. | $a \pm S_a$ | $b \pm S_b$ | As | Ex |
|---------|-------------------------------------|---------|------------------|----------------------|----------------------|--------|-------|
| Печінка | $Y = 8,386 \cdot A - 1,152 \cdot B$ | 89,97 | 62,79 P<0,001 | $8,386 \pm 1,114^*$ | $-1,152 \pm 0,266^*$ | 0,44 | -0,75 |
| | t=7,53 P<0,001 | | | t=-4,33 P<0,001 | P=0,66 | P=0,45 | |
| М'язи | $Y = 13,85 \cdot A - 2,062 \cdot B$ | 87,64 | 49,62 P<0,001 | $13,851 \pm 1,959^*$ | $-2,062 \pm 0,459^*$ | 0,91 | 0,64 |
| | t=7,20 P<0,001 | | | t=-4,49 P<0,001 | P=0,36 | P=0,52 | |

* - значення коефіцієнту вірогідне

Множинне порівняння групових середніх трифакторного дисперсійного комплексу, сформованого за комбінаційною таблицею даних, підтвердило прямий характер дозової і зворотний - вікової залежності інтенсивності малатдегідрогеназної реакції в умовах оксалатного пресингу, причому МДГ м'язової тканини виявилася більш чутливою до нього (табл. 4). Знайдено також низку відмінностей між груповими середніми при сумісній дії досліджених факторів і різних комбінаціях градацій (у таблиці не наведені), що доводить реальність виявленого МДГ-гальмівного ефекту щавлевої кислоти.

Усі регульовані фактори вірогідно впливають на результативну ознаку Y (табл. 5). Найбільшим показником сили впливу η^2 характеризується фактор B (вік тварин) – близько 45% від загального варіювання Y обумовлено саме онтогенетичною компонентою (P<0,001). Дещо меншими є внески факторів A (8,9%) і C (7,0%).

Недоведеним виявляється сумісний вплив цих факторів у будь-яких комбінаціях, що, зрозуміло, не спростовує висновок про вірогідність їх дії взагалі. Це свідчить лише про те, що кожен з факторів діє однаково при всіх градаціях інших факторів. Так, у м'язах міжгрупове варіювання (за часткою суми усіх факторних дев'ят у спільній дисперсії) визначає 68,3% мінливості

результативної ознаки, а на внутрішньогрупові (випадкові) фактори припадає 31,7% її варіабельності.

Таблиця 4.

Параметри групових середніх для ізольованої дії факторів.

| Фактори | Градації | N | $y \pm S_y$ | P (за Тьюкі) |
|---------|-------------|----|--------------|--------------|
| А | 2 ммоль/л | 16 | 8,384±1,216 | 0,0160* |
| | 2,5 ммоль/л | 16 | 12,846±1,216 | |
| В | 6 міс. | 16 | 15,619±1,216 | 0,00016* |
| | 12 міс. | 16 | 5,619±1,216 | |
| С | печінка | 16 | 8,639±1,216 | 0,0307* |
| | м'язи | 16 | 12,591±1,216 | |

Примітка: * - різниця вірогідна

Таблиця 5.

Результати дисперсійного аналізу

| Варіація | D | K | σ^2 | η^2 | F_ϕ | P для $\alpha=5\%$ |
|----------------|----------|----|------------|----------|----------|--------------------|
| По фактору А | 159,311 | 1 | 159,311 | 0,089 | 6,73* | 0,016 |
| По фактору В | 801,200 | 1 | 801,200 | 0,448 | 33,85* | 0,0 |
| По фактору С | 124,899 | 1 | 124,899 | 0,070 | 5,28* | 0,031 |
| Спільна по АВ | 29,876 | 1 | 29,876 | 0,017 | 1,26 | 0,272 |
| Спільна по АС | 60,886 | 1 | 60,886 | 0,034 | 2,57 | 0,122 |
| Спільна по ВС | 41,087 | 1 | 41,087 | 0,023 | 1,74 | 0,200 |
| Спільна по АВС | 3,9621 | 1 | 3,962 | 0,002 | 0,17 | 0,686 |
| Випадкова | 568,105 | 24 | 23,671 | 0,317 | - | - |
| Загальна | 1789,327 | 31 | - | - | - | - |

$F_{st} = |4,26-7,82-14,0|$ для $\alpha=5\%$, 1% і 0,1% відповідно

Примітка: * - вплив фактору вірогідний

Висновки: Щавлева кислота в концентраціях 2 і 2,5 ммоль/л пригнічує *in vitro* малатдегідрогеназну реакцію в без'ядерних гомогенатах печінки та скелетних м'язів білих щурів.

1. Оксалатзалежне гальмування МДГ-реакції Y характеризується прямою дозовою (фактор А) та зворотною віковою (фактор В) залежністю відповідно до наступних рівнянь множинної регресії: $Y=8,386 \cdot A - 1,152 \cdot B$ (печінка), $Y=13,85 \cdot A - 2,062 \cdot B$ (м'язи).

2. МДГ м'язової тканини виявляє більшу чутливість до оксалатної інтоксикації.

3. Кожен з факторів (концентрація щавлевої кислоти, вік тварин, вид органу) впливає на активність МДГ при ізольованій дії, і цей ефект не залежить від градації решти факторів.

4. Сумарна дія регульованих факторів визначає переважну частку (68,3%) загальної мінливості результативного фактору.

Література

1. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд. Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
2. Нейко Е.М., Дельва Ю.В. Дисметаболизм щавелевой кислоты // *Врачебное дело*. – 1991. – № 5. – С. 25-28.
3. Тюрин Ю.Н., Макаров А.А. Статистический анализ данных на компьютере. – М.: ИНФРА-М, 1998. – 528 с.
4. Hodgkinson A. Oxalic acid in biology and medicine. – London: Academic Press, 1977. – 168 p.
5. Malik P., McKenna M.C., Tildon J.T. Regulation of malate dehydrogenases from neonatal, adolescent, and mature rat brain // *Neurochem Res*. – 1993. – 18 (3). – P. 247-257.

Summary

ROLE OF OXALIC ACID IN A REGULATION OF MALATE DEHYDROGENASE ACTIVITY OF ANIMALS

The influence *in vitro* exogenous oxalic acid on activity of malate dehydrogenase in a liver and skeletal muscles is investigated. The parameters of dependence of the enzyme repression on age of animals, oxalate concentration and kind of organ are determined.

УДК 636.612.32:633.31(05)

МОРФОЛОГО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ СВИНЕЙ ЗА ТРИВАЛОГО СПОЖИВАННЯ РАЦІОНІВ НАСИЧЕНИХ ТРАВОЮ ЛЮЦЕРНИ

Р.А.Чудак, Т.В.Мельникова, Н.А. Бережнюк, Г.М. Огороднічук
Вінницький державний аграрний університет

У статті подано результати дослідження дії часткової заміни концентрованих кормів у раціонах ремонтних свиней травою люцерни сорту Вінничанка на будову окремих зон кіркової та мозкової речовини надниркових залоз та їх глюкокортикоїд-синтетичну активність.

Ключові слова: люцерна, свині, наднирники, кіркова речовина, мозкова речовина, глюкокортикоїди, кортизол.

Вступ. На думку багатьох вчених, найважливішу роль у компенсаторно-приспосувальних реакціях організму та перетворенні білків, жирів та вуглеводів відіграють наднирники [1,2]. На даний час дослідженню морфолого-функціональних змін цих залоз під дією екзо- та ендогенних подразників приділяється багато уваги. У тваринництві найбільше значення мають експерименти з вивчення характеру впливу різних кормових чинників на будову і активність наднирників. Так, за повідомленнями О.Т.Бусенка [4], низь-

кий рівень годівлі тварин викликає затримку росту ендокринних залоз, зниження гормональної інкреції, особливо кори наднирників, що обумовлює пригнічення процесів синтезу в організмі. Дослідженнями окремих вчених встановлено, що введення до раціонів свиней окремих видів кормів (наприклад, патоки, жиру та ін.) [3]. Інші пов'язують зміни уданій залозі внутрішньої секреції з відповіддю організму на стрес, що викликаний дією кормового чинника [1].

Методика дослідження. З метою вивчення характеру дії раціонів, насичених травою люцерни, на функціонування і гістологічну структуру надниркових залоз свиней великої білої породи у акціонерному товаристві приватних власників "Родина" Калинівського району Вінницької області у 1995-1999 роках були проведені науково-господарський та фізіологічний досліди за наведеною в таблиці 1 схемою.

Для дослідження поставленої мети експерименти проводили на свинях двох поколінь за методом груп, який найкраще відповідає умовам утримання тварин.

Тварин усіх груп забезпечували поживними речовинами згідно норм, враховуючи вік, живу масу та заплановані середньодобові прирости. По мірі росту свиней добові добавки кормів збільшували, не змінюючи їх співвідношення.

Кормові суміші готувались безпосередньо у господарстві за однією, чітко визначеною технологією. Як мінеральну добавку вводили комплекс макро- і мікроелементів. Траву люцерни перед згодовуванням подрібнювали на частки не більше 0,5-1 см. Корми згодовували у зволоженому вигляді (1: 1,5). Впродовж досліду тварин утримували групами в одному типовому приміщенні. Годували свиней два рази на добу, поїли – вволю, через 1-1,5 години після годівлі.

Кров для дослідження вмісту кортизолу брали у тварин (4 із кожної групи) у першому та другому поколінні на початку та в кінці основного періоду. Концентрацію кортизолу в сироватці крові визначали імунно-ферментним методом [7] за допомогою спеціального обладнання компанії Amercham.