

УДК 616.36-019:577.15:547.461.2

ХАРАКТЕРИСТИКА ОКСАЛАТЗАЛЕЖНОГО ГАЛЬМУВАННЯ *IN VITRO* ІНТЕНСИВНОСТІ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ РЕАКЦІЇ У ТКАНИНІ ПЕЧІНКИ

К.М. Хлус

НДІ медико-екологічних проблем МОЗ України

В ткани печени белых крыс установлено *in vitro* индуцированное щавелевой кислотой снижение интенсивности ферментативной реакции, катализируемой L-лактат: NAD оксидоредуктазой (КФ 1.1.1.27), что позволяет рассматривать оксалаты как мощный экологический фактор. Показана дозозависимость эффекта в интервале концентраций 0,1-1,0 ммоль/л, описываемая на 76,04% уравнением сигмоидной регрессии $Y=e^{(3,7737-0,1344/X)}$.

Щавелевая кислота, лактатдегидрогеназа печени, ингибирование

ВСТУП

Щавлева кислота та її солі є важливими компонентами продуктів з повсякденного раціону людини. Беручи до уваги відомі несприятливі ефекти оксалатів (кальційоксалатний літогенез із пошкодженням функції нирок, гіпокальціємію тощо), їх можна вважати впливовими екологічними факторами, ефект яких істотно збільшується при ендогенних порушеннях оксалатного метаболізму [3, 7]. Нами раніше показано, що серед провідних механізмів біологічної дії оксалат-аніону значну роль відіграє пригнічення інтенсивності низки ферментативних реакцій [5, 6]. Проте параметри та механізми таких ефектів залишаються нез'ясованими.

У даному повідомленні представлено результати дослідження *in vitro* характеру та ступеня гальмівної дії щавлевої кислоти на активність L-лактат: NAD оксидоредуктази (лактатдегідрогеназа, ЛДГ, КФ 1.1.1.27) – ключового ферменту енергетичного метаболізму – з тканини печінки білих щурів.

УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Визначали активність ЛДГ (по реакції відновлення піровиноградної кислоти до молочної) в без'ядерних гомогенатах тканини печінки білих безпородних шурів ($n=12$) віком 6 місяців відомими методами [2]. Окремо визначали активність ферменту через 5 хв після внесення до реакційного середовища різних об'ємів розчину шавлевої кислоти, так, щоби її кінцева концентрація склала 0,1; 0,25; 0,5 або 1,0 ммоль/л. Вираховували ступінь зниження інтенсивності ферментативної реакції (в %).

Отримані дані піддавали кореляційно-регресійному та дисперсійному аналізу з використанням комп'ютерних математично-статистичних програм Excel 2000, NCSS 2000 і Statgraphics Plus 3.0 [1, 4]. При проведенні однофакторного дисперсійного аналізу первинні дані зводили у комбінаційну таблицю по 2-8 варіант у кожній із 4-х градацій (=концентрацій шавлевої кислоти) організованого фактору А, тобто ступеня інгібування ЛДГ. Розраховували факторіальну D_A , випадкову, або залишкову D_e та спільну D_Y дев'яти (суми квадратів відхилень); 2) відповідні вибіркові дисперсії (середні квадрати відхилень) σ_A^2 , σ_e^2 і σ_Y^2 ; 3) ступені свободи k_A , k_e і k_Y ; 4) показник сили впливу фактора А із помилкою $\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$; 5) емпіричне значення F-критерія Фішера F_Φ ; 6) вірогідність помилкової оцінки Р.

Обчислювали групові середні інгібування та їх стандартні відхилення по кожній градації комплексу. Однорідність дисперсій по окремих градаціях оцінювали за критеріями Кохрена, Бартлета (найбільш придатного при різнорозмірності вибірок, по яких здійснюється оцінка) і Хартлі. Достовірність різниці між груповими середніми оцінювали із застосуванням семи різних тестів множинного порівняння, які використовують як помилку різниці корінь квадратний із відношення σ_e^2 до загальної кількості варіант.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Згідно проведеного кореляційного аналізу, існує досить висока дозозалежність зниження активності ЛДГ за умов дії шавлевої кислоти. Параметричний коефіцієнт кореляції (за Пірсоном) дорівнює 0,691

$\pm 0,1616$. За величинами t-критерію Ст'юдента=4,279 и F-критерія Фішера=16,47 цей результат є високодостовірним на третьому рівні ймовірності безпомилкових оцінок, $P < 0,001$. Непараметричний коефіцієнт рангової кореляції (за Спірменом) має ще більшу величину - 0,7301; з $t = 4,533$ і $P < 0,001$.

Проте здійснений надалі регресійний аналіз показав, що рівняння лінійної регресії загального виду $Y = a + b \cdot X$ не достатньо адекватно описує зв'язок між ступенем інгібування ЛДГ (Y) і концентрацією шавлевої кислоти (X) (табл. 1). Порівняння 10 альтернативних моделей (усі з яких є

Таблиця 1 – Параметри зв'язку між ступенем інгібування ЛДГ і концентрацією шавлевої кислоти в залежності від типу регресії

Назва залежності	Тип регресії	Запропонована модель	r	R-кв., %
Сигмоїдна	$Y = e^{(a+b/X)}$	$Y = e^{(3,7737-0,1344/X)}$	-0,872	76,04
Подвійна реципрокна	$Y = 1/(a+b/X)$	$Y = 1/(0,0172+0,0075/X)$	0,861	74,20
Ступенева	$Y = a \cdot X^b$	$Y = 41,3895 \cdot X^{0,5036}$	0,827	68,33
Реципрокна по X	$Y = a + b/X$	$Y = 40,9064 - 2,9387/X$	-0,781	61,04
Поліноміальна	$Y = a + b \cdot X + c \cdot X^2$	$Y = 5,4357 + 83,5345 \cdot X - 50,1268 \cdot X^2$	0,769	59,20
Логарифмічна	$Y = a + b \cdot \ln X$	$Y = 40,1455 + 11,4367 \cdot \ln X$	0,769	59,17
Коренева по X	$Y = a + b \cdot \sqrt{X}$	$Y = 4,7898 + 36,016 \cdot \sqrt{X}$	0,736	54,21
Коренева по Y	$Y = (a + b \cdot X)^2$	$Y = (3,9510 + 2,4656 \cdot X)^2$	0,710	50,34
Експоненціальна	$Y = e^{(a+b \cdot X)}$	$Y = e^{(2,6989 + 1,0383 \cdot X)}$	0,709	50,33
Лінійна	$Y = a + b \cdot X$	$Y = -16,23 + 24,6785 \cdot X$	0,691	47,79

вірогідними з $F = 16,47 - 57,12$) за величинами коефіцієнтів детермінації (R-кв.) дозволило визначити, що найбільш повно досліджуваній залежності відповідають рівняння сигмоїдної (S-подібної) і подвійної реципрокної регресії, які на три чверті пояснюють варіювання гальмівного ефекту змінами концентрації діючої сполуки. Подальший аналіз цих двох рівнянь надав можливість остаточно визначитися з найбільш адекватним до досліджуваної закономірності видом регресії. Із даних таблиці 2

впливає, що за F-критерієм перевагою володіє модель сигмоїдної залежності, а окремі її компоненти, зокрема вільний член регресії a , відзначаються порівняно більшими величинами t-критерію Ст'юдента. Асимптотичний коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами a та b рівняння $Y=e^{(a+b/X)}$, який дорівнює $-0,740$, є набагато нижчим за граничний рівень ($=0,95$), що свідчить про високу точність оцінки даних параметрів. Отже, можна вважати доведеним S-подібний характер залежності гальмування лактатдегідрогеназної реакції у тканині печінки білих щурів шавлевою кислотою в обраному діапазоні її концентрацій.

З метою оцінки сили та достовірності знайдених дозозалежних ефектів шавлевої кислоти на активність ЛДГ застосували метод однофакторного дисперсійного аналізу. Виявлено значну інгібуючу дію

Таблиця 2 – Показники вірогідності параметрів запропонованих рівнянь регресії

Параметр рівняння	Тип регресії	Стандартна помилка	F	t	P
a	$Y=e^{(a+b/X)}$	0,086	-	44,04 4	0,0
	$Y=1/(a+b/X)$	0,0050	-	3,416	0,003
b	$Y=e^{(a+b/X)}$	0,018	-	-7,558	0,0
	$Y=1/(a+b/X)$	0,0010	-	7,194	0,0
Модель в цілому	$Y=e^{(a+b/X)}$	-	57,12	-	0,0
	$Y=1/(a+b/X)$	-	51,76	-	0,0

шавлевої кислоти щодо ЛДГ печінки (табл. 3). Середнє зниження її активності дорівнює 30,9% при послідовному зростанні від 11,80% до 38,96% зі збільшенням концентрації ксенобіотику від 0,1 до 1,0 ммоль/л. Треба відмітити, що між найменшим (1,98) і найбільшим (10,46) стандартними відхиленнями існує більш, ніж трикратна різниця, тоді як при проведенні дисперсійного аналізу приймається їх визначальна рівність на всіх градациях фактора. Тому для перевірки однорідності дисперсій

Таблиця 3 – Характеристика групових середніх

Статистичний параметр	Концентрація шавлевої кислоти, ммоль/л				Загальна по комплексу
	0,1	0,25	0,5	1,0	
Кількість варіант	4	2	6	8	20
Групова середня з помилкою	11,80±2,35	28,90±1,40	33,60±3,77	38,9±3,70	30,92±2,94
±σ	4,71	1,98	9,23	10,46	13,17

були розраховані критерії Кохрена, Бартлета і Хартлі, величина яких склала 0,496; 1,295 і 27,93 відповідно, що підтвердило нульову гіпотезу про подібність усіх дисперсій ($P > 0,05$).

За результатами множинного порівняння групових середніх показано достовірність різниці між ефектами двох граничних (0,1 і 1,0 ммоль/л) концентрацій шавлевої кислоти, а за трьома тестами (Дункана, Фішера і Ньюмана-Кеулса) підтверджується різниця в дії концентрацій 0,1 и 0,25 ммоль/л (табл. 4).

Таблиця 4 – Множинне порівняння групових середніх

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

Примітка: вказано концентрації, з якими існує достовірна різниця при $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$)

Таблиця 5 – Результати дисперсійного аналізу

Варіація	D	k	σ	F_{ϕ}	F_{st} для рівня значущості α		
					5%	1%	0,1%
Факторна	2031,01	3	677,0	8,58*	3,24	5,29	9,0
Випадкова	1262,78	16	78,92	-			
Загальна	3293,79	19	173,36	-			
P	0,0013*						
$\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$	0,617 \pm 0,0719						

Примітка: * - вплив фактору вірогідний

Однофакторний дисперсійний аналіз доводить вірогідність впливів щавлевої кислоти (табл. 5). Факторіальна дев'ята, яка характеризує міжгрупове варіювання щодо діючого фактору, є значно більшою за залишкову дев'яту D_e , яка вказує на рівень внутріпіньогрупової міцливості. Як результат, емпіричний критерій Фішера F_{ϕ} перевищує F_{st} на 2-му рівні значущості ($\alpha=1\%$). Це означає, що різноманітність групових середніх удисперсійному комплексі не може бути пояснена тільки випадковими впливами, а визначається в основному дією досліджуваного фактору. Даний висновок підтверджується низьким значенням ймовірності помилкового заперечення нульової гіпотези $P=0,0013$.

ВИСНОВКИ

1. Щавлева кислота гальмує *in vitro* інтенсивність ключової реакції енергетичного обміну, яку каталізує лактатдегідрогеназа печінки білих щурів, що дозволяє вважати її потужним екологічним фактором.
2. Спостерігається виражена дозозалежність ефекту в інтервалі концентрацій щавлевої кислоти 0,1-1,0 ммоль/л.
3. Зв'язок ступеня інгібування ЛДГ з діючою концентрацією щавлевої кислоти описується рівнянням сигмоїдної регресії $Y=e^{(3,7737-0,1344/X)}$, яке на 76,04% (за величиною коефіцієнта детермінації $R_{ст}$) пояснює дисперсію активності ЛДГ змінами концентрації ксенобіотика.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Морин, 2000. – 320 с.
2. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд. Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
3. Нейко Е.М., Дельва Ю.В. Дисметаболизм щавелевой кислоты // *Врачебное дело*. – 1991. № 5. – С. 25-28.
4. Тюрин Ю.Н., Макаров А.А. Статистический анализ данных на компьютере. – М.: ИНФРА-М, 1998. – 528 с.
5. Хлус К.Н. Биохимические механизмы токсического действия оксалатов // *Укр. биохим. журн.* - 1998. - 70, № 3. - С. 95-102
6. Хлус К.Н., Бойко Л.Е., Толстюк С.М., Хлус Л.Н. Механизм токсического действия оксалатов как потенциальных факторов экологической агрессии - ингибирование ферментов энергетического метаболизма // *Экология и жизнь (наука, образование, культура)*. - Международный сборник статей. - Вып. 4. - Новгород, 1998. - С. 53-60.
7. James L.F. Oxalate toxicosis // *Clin. Toxicol.* - 1972. - 5, № 2. - P. 231-243.

CHARACTERISTIC OF OXALATE DEPENDENT INHIBITION IN VITRO OF THE RATE OF LACTATE DEHYDROGENASE REACTION IN A LIVER TISSUE

K.M. Khilus

Oxalates are powerful ecological factor because oxalic acid decrease strongly a rate of lactate dehydrogenase reaction in vitro in a liver tissue. The doze-dependence effect in an interval of concentration on 0,1-1,0 mmol/l is described by the equation of S-curve regression $Y=e^{(3,7737-0,1344/X)}$.