

УДК 547.461.2:577.152.1

Буковинська державна медична академія м. Чернівці

ОКСАЛАТ-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ *IN VITRO* МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ МІОКАРДА Й НИРОК

Ключові слова: щавлева кислота, оксалати, малатдегідрогеназа, інгібування, міокард, нирки.

Резюме. Вивчено зміни малатдегідрогеназної активності білих щурів за дії щавлевої кислоти *in vitro* у тканинах із переважно аеробним типом метаболізму (міокард, нирки). Визначено особливості впливу оксалату на інтенсивність малатдегідрогеназної реакції у зв'язку з концентрацією діючої речовини, віком тварин і типом тканини.

Вступ

Одним із провідних шляхів оцінки стану окремих ферментативних ланок на рівні ключових енергетичного обміну вважається вивчення реакцій, від активності яких залежить перебіг усього процесу в цілому. Особливе значення в енергетичному метаболізмі міокарду та нирок -органів з інтенсивним аеробним метаболізмом - належить ферменту малатдегідрогеназі (L-малат: NAD⁺оксидоредуктаза, МДГ, КФ 1.1.1.37). Він є одним із найпоширеніших тканинних ферментів, який виявлено в більшості живих організмів: бактеріях, грибах, протистах, рослинах, безхребетних і хребетних тваринах [3, 4, 13, 15]. Біологічне значення МДГ визначається, перш за все, її ключовою роллю в циклі трикарбонових кислот, а також активною участю у функціонуванні малат-аспартатного "човникового" механізму транспорту відновлених еквівалентів.

Відомо два ізоферменти МДГ: цитоплазматичний (цМДГ) і мітохондріальний (мМДГ), які відрізняються між собою за фізико-хімічними та каталітичними характеристиками і, в свою чергу, можуть бути поділені на 5-6 субфракцій [2, 4]. Вивчення алостеричної регуляції МДГ (переважно субстратами гліколізу та циклу Кребса) показало, що лактат інгібує активність лише цМДГ (конкурентно); оксалоацетат гальмує мМДГ (неконкурентно) і цМДГ (конкурентно) [2, 14]. Малат пригнічує цМДГ, альфа-кетоглутарат інгібує обидва ізоферменти за конкурентним механізмом (пригнічення мМДГ є більш значним), а цитрат, навпаки, за неконкурентним. Указані механізми здійснюють ефективну регуляцію інтенсивності аеробних процесів біологічного окиснення, забезпечуючи адекватну реакцію клітини на швидкоплинні зміни енергетичних потреб.

Раніше висловлювалося припущення, що один з кінцевих продуктів обміну речовин і поширений компонент раціону людини - щавлева кислота - може реалізовувати свою токсичну дію через пригнічення деяких важливих ферментів енергетичного метаболізму [11], але досліджень впливу оксалат-аніону на МДГ досі не здійснювалося. Нами встановлено, що щавлева кислота пригнічує *in vitro* МДГ печінки та скелетних м'язів - тканин з переважно анаеробним типом обміну речовин [10], проте питання про особливості впливу на МДГ тканин із вираженим аеробним метаболізмом (міокарда, нирок тощо) залишається нез'ясованим.

Мета дослідження

Встановити параметри оксалат-індукованих змін загальної активності МДГ тканин міокарда та нирок білих щурів.

Матеріал і методи

Предмет дослідження: без'ядерні гомогенати міокарду та нирок білих щурів віком 6 і 12 міс. (n=8). Об'єкт дослідження: вплив *in vitro* щавлевої кислоти (в кінцевих концентраціях 2 і 2,5 мМ) на активність МДГ, яку визначали кінетичним методом за збільшенням вмісту NADH у реакції взаємодії L-малату та NAD⁺ [6]. Розчин щавлевої

кислоти вносили до системи за 5 хв. до ініціації реакції розчином NAD+.

При аналізі застосовували комп'ютерні пакети математико-статистичних програм NCSS 2000 і Statgraphics Plus 5.1. Після обчислення результативної ознаки Y - ступеня оксалат-індукованого зниження інтенсивності МДГ-реакції (в %) виявляли залежність Y від концентрації діючої речовини та віку тварин за коефіцієнтами кореляції: параметричної за Пірсоном з помилкою $\pm S_r$, непараметричної за Спірменом r_s і множинної $r_{X(AB)}$ [9]. Виводили відповідні рівняння лінійної регресії; їх правильність підтверджували дисперсійним аналізом за F-критерієм, внесок обраних регресійних моделей у пояснення варіабельності результативної ознаки оцінювали за коефіцієнтами детермінації (R-квадрат), а для підтвердження значущості коефіцієнтів кореляції розраховували t-критерій Стьюдента.

За первинними даними створювали рівномірний дисперсійний статистичний комплекс, який оцінювали трифакторним дисперсійним аналізом. При цьому визначали залежність ступеня гальмування МДГ-реакції від 3-х регульованих у досліді факторів (фактор А - концентрація щавлевої кислоти; В - вік тварин; С - тип тканини), 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 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 [9].

По кожній градації дисперсійного комплексу обчислювали групові середні зі стандартними помилками $u \pm S_y$. Вірогідність різниці між груповими середніми оцінювали із застосуванням тестів множинного порівняння (перевагу віддавали методу Тьюкі).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результати дії щавлевої кислоти на МДГ міокарда і нирок наведені в таблиці 1. В обраному діапазоні концентрацій не виявлено дозової та онтогенетичної залежності ступеня пригнічення МДГ-реакції в нирках (табл. 2). Інгібування МДГ у міокарді помірно корелює з концентрацією щавлевої кислоти та віком тварин ($r=0,484$ і $0,504$, відповідно). Хоча вірогідних значень ($P<0,05$) ця кореляція набуває лише в останньому випадку, порівняно більше значення коефіцієнта множинної кореляції ($R_B=0,59$) вказує на певну детермінованість ефекту і дозою ксенобіотику.

Пряма залежність ступеня пригнічення активності МДГ від концентрації щавлевої кислоти та віку тварин підтверджується рівняннями множинної регресії: $Y=0,405 \cdot A+352 \cdot B$ для МДГ міокарду і $Y=1,776 \cdot A+0,370 \cdot B$ для МДГ нирок ($P<0,001$) (табл. 3). Згідно величин R-кв. запропоновані моделі певною мірою (на 66,3% - у серці та на 81,8% - у нирках) пояснюють варіабельність Y.

Таблиця 1

Інгібування МДГ активності щавлевою кислотою

Градації факторів			Ступінь пригнічення МДГ-реакції, %				
А, мМ	В, міс.	С, тканина	Варіанти				$x \pm S_x$
			1	2	3	4	
2	6	Міокард	0,0	0,0	0,0	0,44	$0,11 \pm 0,11$
		Нирки	4,07	9,48	0,0	8,72	$5,57 \pm 2,21$
	12	Міокард	3,97	7,92	2,84	2,98	$4,43 \pm 1,19$
		Нирки	7,03	12,0	4,63	5,24	$7,23 \pm 1,67$
2,5	6	Міокард	2,26	5,96	5,67	4,39	$4,57 \pm 1,68$
		Нирки	7,32	3,79	6,11	7,69	$6,48 \pm 0,90$
	12	Міокард	3,31	7,92	2,13	12,77	$6,53 \pm 2,43$
		Нирки	10,16	17,33	5,56	6,28	$9,83 \pm 2,70$

Примітка. * - значення коефіцієнта вірогідне.

Таблиця 2

Параметри кореляційних залежностей

Тканина	Кореляції ступеня інгібування МДГ з відповідними факторами						
	Концентрація		Вік тварин		Концентрація + вік тварин		
	$r \pm S_r$	r_s	$r \pm S_r$	r_s	$R_{X(AB)}$	t	P
Міокард	0,484±0,234 t=2,07 P>0,05	0,504* t=2,18 P<0,05	0,463±0,236 t=1,95 P>0,05	0,435 t=1,81 P>0,05	0,590	2,63*	<0,05
Нирки	0,232±0,260 t=0,89 P>0,05	0,190 t=0,72 P>0,05	0,331±0,252 t=1,31 P>0,05	0,190 t=0,72 P>0,05	0,362	1,40	>0,05

Таблиця 3

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

Тканина	Рівняння	R-кв., %	F-кр.	P
Міокард	$Y = 0,405 \cdot A + 0,352 \cdot B$	66,3	13,79*	<0,001
Нирки	$Y = 1,776 \cdot A + 370 \cdot B$	81,8	31,58*	<0,001

Примітка. * - модель рівняння вірогідна.

Множинне порівняння групових середніх (за Тьюкі) підтвердило прямий характер дозової і вікової залежностей пригнічення МДГ-реакції (табл. 4). Це суттєво відрізняється від залежностей, для МДГ печінки і скелетних м'язів, де чутливість МДГ до оксалату з віком зменшувалася [10]. До того ж ступінь гальмування МДГ печінки й м'язової тканини взагалі виявився більшим в усіх експериментальних групах тварин: так, за дії щавлевої кислоти в концентраціях 2,0 і 2,5 мМ він становив, відповідно 8,3 і 12,8% (в 2 рази вище, ніж у тканинах міокарда і нирок) [10].

Показник сили впливу регульованих у дослідженні факторів η^2_x виявився досить значним -43,4%, причому усі досліджувані фактори мають вірогідний внесок у мінливість ступеня інгібування МДГ (табл. 5). Найбільшу роль відіграє фактор С - близько 18% від загального варіювання Y пов'язане з фізіолого-біохімічними відмінностями серцевого м'яза і нирок. Дещо менше значення факторів А (8,9%) і С (7,0%). Невірогідним є сумісний вплив факторів, що вказує на схожий характер дії кожного з них при будь-яких комбінаціях градацій.

Таблиця 4.

Параметри групових середніх для ізольованої дії факторів (за тестом множинного порівняння)

Фактори	Градації	N	$y \pm S_y$	P (за Тьюкі)
А	2 мМ	16	4,333±0,862	0,0160*
	2,5 мМ	16	6,853±0,862	
В	6 міс.	16	4,181±0,862	0,00016*
	12 міс.	16	7,004±0,862	
С	Серце	16	3,910±0,862	0,0307*
	Нирки	16	7,275±0,862	

Примітка. * - різниця вірогідна.

Таблиця 5

Результати дисперсійного аналізу

Варіація	D	K	σ^2	η^2	F_ϕ	P для $\alpha=5\%$
За фактором А	50,801	1	50,801	10,070	4,27*	0,050
За фактором В	63,790	1	63,790	12,650	5,37*	0,029
За фактором С	90,590	1	90,590	17,960	7,62*	0,011
Спільна за АВ	0,210	1	0,210	0,043	0,02	0,894
Спільна за АС	4,650	1	4,650	0,922	0,39	0,538
Спільна за ВС	0,800	1	0,800	0,159	0,07	0,797
Спільна за АВС	8,220	1	8,220	1,630	0,69	0,414
Випадкова	285,260	24	11,890	56,563	-	-
Загальна	504,320	31	-	-	-	-
Fst = 4,26-7,82-14,03 для $\alpha=5\%$, 1%, 0,1% відповідно						

Примітка. * - вплив фактора вірогідний.

Таблиця 6

Активність МДГ (нмоль NADH /хв-мг білка) у тканинах міокарда та нирок білих щурів ($\bar{x} \pm S_x$)

Вік тварин, міс.	Тканина	Наші дані	[6]		[7]		[12]
			мМДГ	цМДГ	мМДГ	цМДГ	цМДГ
1	Міокард		-	-	300±30	990±130	-
3	Міокард		-	-	240±30	1570±160	-
6	Міокард	873,85±54,53	-	-	-	-	-
	Нирки	618,95±124,34	-	-	-	-	-
12	Міокард	1122,53±77,51*	-	-	290±50	1560±150	-
	Нирки	675,76±24,62	-	-	-	-	-
24	Міокард	-	-	-	190±130	940±370	-
дорослі, 200-250 г	Міокард	-	1256±78	2095±85	-	-	1640
	Нирки	-	689±71	757±13	-	-	885

Примітка. * - різниця з групою 6-місячних тварин вірогідна ($P < 0,05$).

Встановлені розбіжності можуть бути наслідком органоспецифічних диференціальних змін як загальної активності МДГ, так і її ізоферментного спектру. Відомо, що в сироватці крові активність загальної МДГ знижується майже в 2 рази від грудного до дорослого віку [1, 8]. Навпаки, у тканинах печінки, серця, скелетних м'язів має місце підвищення активності МДГ за час прогресивного і стабільного росту (в щурів - до 12 міс.) з наступним її зменшенням до віку 24 міс., причому воно відбувається переважно за рахунок цМДГ [5, 6, 7]. Нами теж встановлено вірогідне зростання активності МДГ в тканині міокард зі збільшенням віку тварин, подібне до знайденого іншими авторами (табл. 6).

На цьому тлі відбуваються значні зміни ізоферментного спектру МДГ. Зокрема, в сироватці крові немовлят переважає мМДГ, тоді як активність цМДГ мінімальна [8]. З віком активність МДГ перерозподіляється в напрямку відносного збільшення цитоплазматичних фракцій [1; 8]. У серці одномісячних щурів частка мМДГ становить 23,8%, у 3-місячному віці вона падає до 13,3%, а потім зростає до 16,8% [7].

У нашому дослідженні МДГ активність у міокарді виявилася вищою за таку в нирках (табл. 6), що збігається з даними інших авторів, наведеними в таблиці.

У цілому дані результати узгоджуються з повідомленнями щодо характеру розподілу загальної МДГ-активності в різних тканинах білих щурів, згідно яких найбільшою вона є в міокарді та нирках, значно меншою - у скелетній мускулатурі і

печінці (співвідношення активності МДГ у цих органах - 100: 65 : 38 : 39) [4].

Висновки

1. Щавлева кислота в концентраціях 2 і 2,5 ммоль/л пригнічує *in vitro* малатдегідрогеназну реакцію у тканинах міокарда і нирок білих щурів віком 6 і 12 місяців.
2. Оксалат-індуковане гальмування МДГ-реакції описується прямими дозовою та віковою залежностями згідно з наступними рівняннями множинної регресії: $Y=0,405 \cdot A - 0,352 \cdot B$ (міокард), $Y=1,776 \cdot A + 0,370 \cdot B$ (нирки).
3. Поєднаний вплив регульованих у досліді факторів визначає 43,8% загальної мінливості результативного фактора.
4. Досліджувані фактори при ізольованій дії вірогідно впливають на варіабельність оксалат-індукованого інгібування МДГ, а ефект кожного з них не залежить від градацій інших факторів.

Наступними завданнями в дослідженні оксалат-залежних змін активності МДГ можуть стати: 1) здійснення порівняльного аналізу таких ефектів у тканинах з різними (анаеробним та аеробним) типами метаболізму; 2) встановлення характеру оксалатного пригнічення окремих ізоферментів МДГ і відповідних констант інгібування.

Література.

1. Андриуца К.А. Активность изоферментов малатдегидрогеназы у больных вирусными гепатитами, протекающими на фоне других заболеваний // Актуальные вопросы гематологии. - Кишинев: Штиинца, 1986. - С. 9-12.
2. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. - М: Мир, 1981. - 624 с.
3. Выхрестюк Н.П., Буренина Э.А., Ключкова В.И. и др. Влияние некоторых антигельминтных препаратов на углеводный обмен трематоды *Eurytrema pancreaticum* // Мед. паразитол. и паразит. болезни. - 1984. - № 1. - С. 64 - 68.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. - М.: Мир, 1982. - Т. 3. - 1120 с.
5. Ещенко Н.Д., Голубев А.Г., Осадчая Л.М., Путилина Ф.Е. Изменение активности NAD- и NADP-специфичных МДТ при кислородной недостаточности в различных тканях // Вопр. мед. химии.- 1975. - 21. вып. 1. - С. 73-77.
6. Калиман П.А., Амири А., Нечепуренко Л.И. и др. Роль возрастных изменений активности окислительных ферментов в регуляции образования и утилизации восстановительных эквивалентов // Физиология, биохимия и биофизика возрастного развития. - Киев: Наукова думка, 1980. - С.120-125.
7. Рзаеви Р.Г. Показатели лактат- и малатдегидрогеназ и их изоферментов у детей, проживающих в гор. Баку Азербайджанской ССР // Азербайджанский мед. ж. - 1986.-№ 3. - С.42-44.
8. Тюрин Ю.Н., Макаров А.А. Статистический анализ данных на компьютере. - М.: ИНФРА-М, 1998. - 528 с.
9. Хлус К.М. Роль щавлевой кислоты в регуляції активності малатдегідрогенази тварин // Наук. вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини. - 2002. - 4, № 2.- Ч. 2. - С. 119-124.
10. Mahmoud Y.A. el Souod S.M., Niehaus W.G. Purification and characterization of malate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans*. // Arch. Biochem. Biophys.- 1995. - 322, № 1. - P. 69-75.
11. 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.
12. Van Kuijk B.L., Stams A.J. Purification and characterization of malate dehydrogenase from the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. // FEMS Microbiol. Lett. - 1996. - 144, № 2-3. - P. 141-144.

ОКСАЛАТ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ IN VITRO АКТИВНОСТИ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИОКАРДА И ПОЧЕК

К. Н. Хлус

Резюме. Изучены изменения активности малатдегидрогеназы белых крыс под действием щавелевой кислоты *in vitro* в тканях с аэробным типом метаболизма (миокард, почки). Определены параметры влияния оксалата на интенсивность малатдегидрогеназной реакции в связи с концентрацией вещества, возрастом животных и типом ткани.

Ключевые слова: щавелевая кислота, оксалаты, малатдегидрогеназа, ингибирование, миокард, почки.

OXALATE-INDUCED CHANGES IN VITRO OF ACTIVITY OF MALATE DEHYDROGENASE OF THE MYOCARDIUM AND KIDNEYS

K.M. Khlus

Abstract. The changes of activity of malate dehydrogenase of white rats under action of oxalic acid *in vitro* in tissues with aerobic type of metabolism (myocardium, kidneys) are investigated. The parameters of influence of oxalate on intensity malate dehydrogenase reaction in connection with concentration of substance, age of animals and a kind of tissue are determined.

Key words: oxalic acid, oxalates, malate dehydrogenase, inhibition, myocardium, kidneys.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. – 2003. - Vol. 2., № 1. - P. 97-101.