

## АКТИВНІСТЬ $NAD^+$ -ЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ МІТОХОНДРІЙ НИРОК У ЩУРІВ ЗА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РАЦІОНУ НУТРИЄНТАМИ

О. М. ВОЛОЩУК, А. С. БОЙЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012  
e-mail: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Метою даної роботи було дослідження  $NAD^+$ -залежних ензимів циклу Кребса нирок у щурів за умов різної забезпеченості раціону сахарозою та харчовим протеїном. Активність ізоцитратдегідрогенази реєстрували за накопиченням  $NADH$  у реакції перетворення ізоцитрату в  $\alpha$ -кетоглутарат, активність малатдегідрогенази – за накопиченням  $NADH$  у реакції окислення малату при  $\lambda = 340$  нм. Активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази визначали спектрофотометрично за інтенсивністю окислення  $\alpha$ -кетоглутарату при  $\lambda = 417$  нм. Дослідження проводили на 4 групах тварин: I група – інтактні тварини (К); II група – щури, які перебували на низькопротеїновому раціоні (НПР); III група – щури, які перебували на високосахарозному раціоні (ВС); IV група – щури, які отримували низькопротеїновий/високосахарозний раціон (НПР/ВС). Показано, що у тварин за умов споживання низькопротеїнового раціону спостерігається підвищення ізоцитратдегідрогеназної активності на тлі збереження на рівні показників контролю  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей. Аналогічна тенденція характерна для тварин, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон. Водночас максимально виражене підвищення ізоцитратдегідрогеназної,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей характерне для тварин, які споживали високосахарозний раціон. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що активація  $NAD^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса за умов споживання високосахарозного раціону може розглядатися як одна з можливих ланок механізму ушкодження нирок та дозволить біохімічно обґрунтувати підходи до корекції нефротичних ускладнень за нутрієнтного дисбалансу.

**Ключові слова:** нутрієнти, нирки, мітохондрії, ізоцитратдегідрогеназа, малатдегідрогеназа,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа

**Вступ.** Нині питання механізмів формування метаболічних порушень у нирках за умов аліментарного дисбалансу залишається відкритим (Mise et al., 2020; Engeham et al., 2012). Показано, що наслідком хронічного споживання низькопротеїнового раціону може бути зниження маси нирок, порушення фільтраційної здатності клубочків, запалення ниркових каналців (Fotheringham et al., 2021). Водночас надмірне споживання сахарози індукує розвиток та прогресування хронічної ниркової недостатності (Mahajan et al., 2020), тригером виникнення якої є окисно-відновний дисбаланс та внутрішньониркове запалення (Amorim et al., 2019).

Гомеостатична функція нирок забезпечується низкою процесів, які потребують значних витрат АТФ – підтримання балансу електролітів і кислотно-лужного стану, виведення токсичних речовин, реабсорбція поживних речовин (Hallan, Sharma, 2016). Ключову роль у забезпеченні функціональної активності нирок, органу з високи-

ми потребами в енергії, відіграють мітохондрії (Liu et al., 2020). За кількістю мітохондрій та інтенсивністю споживання кисню нирки займають друге місце після серця (Galvan et al., 2017). При цьому метаболічна активність мітохондрій є визначальною для підтримання функціонування нирок (Clark, Parik, 2021).

Показано, що дисфункція мітохондрій, що виникає внаслідок порушення регуляції роботи дихального ланцюга, зниження мембранного потенціалу, супроводжується зменшенням вмісту АТФ та інтенсифікацією генерації АФК, що сприяє пошкодженню нирок (Bhatia et al., 2020; Ruiz-Ramírez et al., 2020). У нормі в нирках біля 90 % АТФ, необхідної для реабсорбції глюкози, іонів та метаболітів, утворюється шляхом окисного фосфорилування (Braga, et al., 2022), при цьому дисбаланс процесів енергоутворення в першу чергу буде супроводжуватися порушенням реабсорбційної та фільтраційної здатності нирок. Слід відмітити, що ниркові клубочки як

енергетичний субстрат переважно використовують глюкозу, тоді як ниркові каналці – жирні кислоти. При цьому принаймні 50 % утвореної у нирках АТФ за фізіологічних умов використовується для роботи  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази, що необхідно для транспорту розчинених речовин (Liu et al., 2020).

Важливими показниками стану системи енергозабезпечення нирок є активність  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса (Forbes, 2016). Показано, що за умов незбалансованого харчування відбуваються значні перебудови мітохондріальних метаболічних шляхів, зокрема циклу трикарбонових кислот, який є фундаментальним у процесах забезпечення клітини енергією та перетворенні органічних речовин. У той же час розуміння механізмів регуляції енергетичного метаболізму нині розглядається як багатообіцяюча стратегія затримки прогресування патологій нирок (Liu et al., 2020). Тому для встановлення ключових ланок порушення функції нирок за умов нутрієнтного дисбалансу, зокрема дефіциту протеїну та надлишку сахарози в раціоні, важливим є вивчення активності  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса.

*Мета роботи* – дослідження ізоцитратдегідрогеназної,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей у мітохондріях нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону протеїном та сахарозою.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на статевозрілих білих безпородних щурах масою 130-140 г. Маніпуляції з тваринами відповідали положенням «Європейської конвенції про захист хребтних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики. Щурів утримували в пластикових клітках з піщаною підстилкою, доступом до води *ad libitum*.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи: I група – щури, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні (К); II група – щури, які перебували на низькопротеїновому раціоні; III група – щури, які перебували на високосахарозному раціоні (BC); IV група – тварини, які перебували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні (НПР/BC). Тварини I групи отримували раціон, що містив 14 % протеїну (у вигляді казеїну), 10 % жирів, 76 % вуглеводів (10% сахарози), збалансований за всіма нутрієнтами. Тварини II групи отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7% протеїну, 10% жирів та 85,3% вуглеводів. Тварин III групи утримували на раціоні, що містив 40 % сахарози та був збалансований за всіма іншими нутрієнтами. Тварини IV

групи отримували раціон, що містив 4,7 % протеїну, 40 % сахарози та збалансоване співвідношення інших нутрієнтів. Тривалість експерименту становила 28 дб. Цервікальну дислокацію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 29-ту добу експерименту (Voloshchuk, Kopylchuk, 2020).

Мітохондріальну фракцію нирок виділяли методом диференційного центрифугування в середовищі, що містило 250 ммоль/л сахарозу, 1 ммоль/л ЕДТА, 10 ммоль/л трис- $\text{HCl}$ ; рН 7,4 (Itoh et al., 2002).

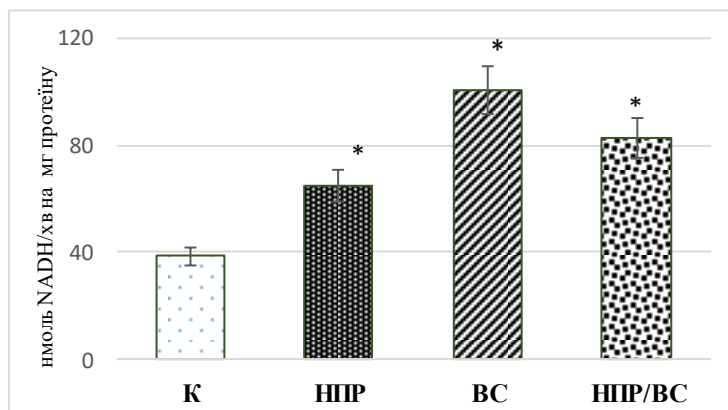
Активність  $\text{NAD}^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса у мітохондріях нирок щурів визначали спектрофотометрично. Активність ізоцитратдегідрогенази реєстрували за накопиченням  $\text{NADH}$  у реакції перетворення ізоцитрату в  $\alpha$ -кетоглутарат (Huang et al., 2000), активність малатдегідрогенази – за накопиченням  $\text{NADH}$  у реакції окислення малату при  $\lambda = 340$  нм (Cetica et al., 2003). Активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази визначали спектрофотометрично за інтенсивністю окислення  $\alpha$ -кетоглутарату при  $\lambda = 417$  нм (Kiss et al., 2013).

Для статичного опрацювання даних кількісні показники обробляли математичними методами, що використовуються в біології, на персональному комп'ютері з використанням пакета аналізу даних Microsoft Excel. Оцінювали середнє значення ( $M$ ) та стандартну похибку середнього ( $m$ ). Для параметричних даних використовували  $t$ -критерій Ст'юдента. Результати вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Результати проведених досліджень показали достовірне підвищення ізоцитратдегідрогеназної активності в мітохондріях нирок тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні (рис. 1). Водночас  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназна та малатдегідрогеназна активності за досліджуваних умов зберігаються на рівні показників контролю (рис. 2, рис. 3). Аналогічна тенденція характерна для тварин, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон. Враховуючи, що підвищення ізоцитратдегідрогеназної активності не супроводжується активацією інших  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса, ймовірно, ця реакція спрямована не на поповнення пулу  $\text{NADH}$ , а на утворення  $\alpha$ -кетоглутарату. Цікаво, що утворений у ізоцитратдегідрогеназній реакції  $\alpha$ -кетоглутарат не використовується для синтезу замінних амінокислот, а метаболізується до цитрату, щоб забезпечити утворення попередників для макромолекулярного синтезу та поповнити пул інтермедіатів циклу Кребса (Wu et al., 2016; Mullen et al., 2011). При цьому мітохондріальний цитрат, транспортований  $\text{SLC25A1}$ , може додат-

ково генерувати ацетил-КоА, який пригнічує аутофагію (Marino et al., 2014). Окрім того показано, що у нирках  $\alpha$ -кетоглутарат переважно бере участь у підтримці кислотно-лужного балансу (Tokonami et al., 2013), а також проявляє антиоксидатні властивості, мінімізуючи таким чином прояви ушкодження нирок (Guo et al., 2022). От-

же, підвищення ізоцитратдегідрогеназної активності можна розглядати як компенсаторну реакцію, спрямовану на підтримання функціональної активності мітохондрій нирок за умов білкової недостатності.



**Рис. 1. Ізоцитратдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок щурів за різної забезпеченості раціону сахарозою та протеїном**

**Fig. 1. The isocitrate dehydrogenase activity in kidney mitochondria from rats that received diets with different contents of sucrose and protein**

Примітка: К – щури, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні; НІР – щури, які перебували на низькопротеїновому раціоні; ВС – щури, які перебували на високосахарозному раціоні; НІР/ВС – тварини, які перебували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні; \* – статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $P \leq 0,05$ ; \*\* – статистично достовірна різниця порівняно з тваринами, які споживали високосахарозний раціон,  $P \leq 0,05$ .

Note (hereinafter): K – animals that received a complete diet; LPD – animals kept on a low protein diet; HSD – animals kept on a high-sugar diet; LPD/HSD – animals that were on a low protein/high sugar diet; \* – significant difference with control group,  $P \leq 0,05$ ; \*\* – statistically significant difference compared with animals that consumed a high-sucrose diet,  $P \leq 0,05$

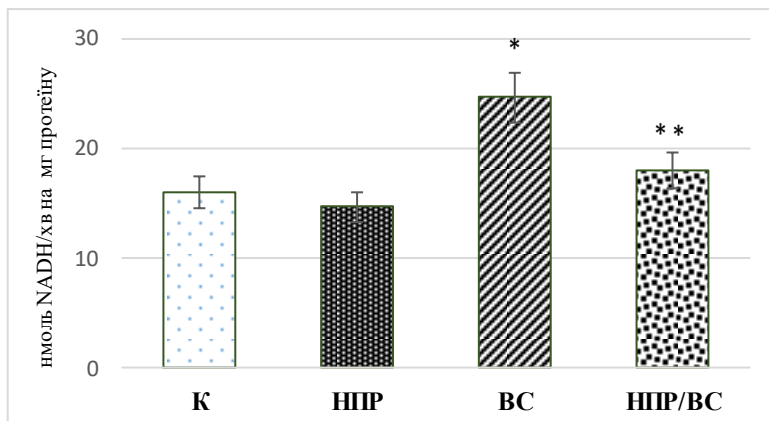
Слід відмітити, що у тварин, яких утримували на високосахарозному раціоні, спостерігається достовірне підвищення активності усіх досліджуваних  $NAD^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса у нирках (рис. 1 – 3). При цьому активність ізоцитратдегідрогенази підвищується у понад 2,5 рази (рис. 1), тоді як активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази і малатдегідрогенази зростає приблизно у 1,5 рази (рис. 2, рис. 3). У літературі показано, що за умов гіперглікемії виникає підвищена потреба в АТФ, необхідної для реабсорбції глюкози у проксимальних каналах нирок, тому для задоволення енергетичних потреб активується цикл Кребса (Hasegawa et al., 2020). Надмірне споживання глюкози призводить до збільшення кількості енергозалежних SGLT транспортерів, які відповідають за реабсорбцію глюкози у нирках. Кількість глюкози, що фільтрується нирками, лінійно підвищується зі збільшенням її концентрації у плазмі, при цьому ниркова реабсорбція глюкози зростає до досягнення певної концентрації глюкози у крові (Wilding, 2014). При цьому посилене надходження глюкози у клітини нирок та активація циклу Кребса буде супроводжуватися активацією утворення

відновних еквівалентів, проте не обов'язково спостерігатиметься активація окисного фосфорилування. Показано, що процес окисного фосфорилування регулюється біодоступністю АДФ, тому підвищення постачання електронів до дихального ланцюга не вимагає пропорційного збільшення продукування АТФ. Тому коли надходження електронів у Q-цикл перевищує потреби у синтезі АТФ, відбувається посилений вихід електронів через утворення супероксид аніон радикалу та надалі пероксиду водню (Muoio, 2014; Smith et al., 2018), що розглядається як один із основних механізмів ушкодження нирок за умов надлишкового споживання сахарози.

Отже, для забезпечення енергетичних потреб нирок за умов надмірного надходження сахарози зростає активність  $NAD^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса. У літературі показано, що за умов гіперглікемії спостерігається посилення експресії мРНК ізоцитратдегідрогенази, що каталізує лімітуючу реакцію циклу Кребса (Sas et al., 2016). Окрім того, виявлено збільшення оборотів циклу Кребса у нирках, проте залишається не зрозумілим, чи збільшення потоку субстратів через цей цикл є причиною чи наслідком мітохондріальної

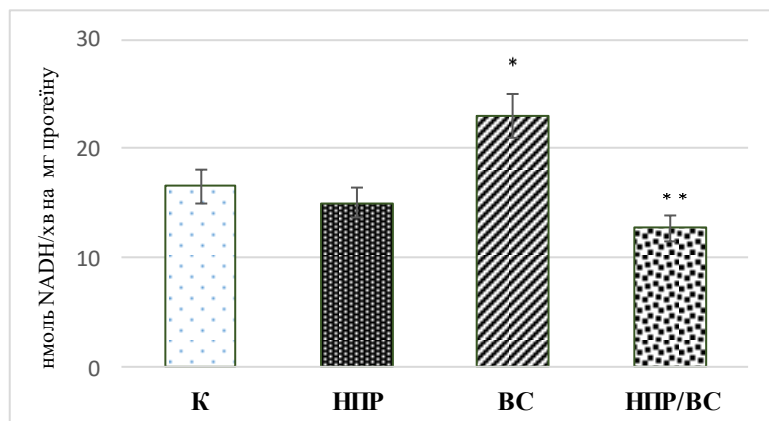
дисфункції. Припускають, що інтенсифікація вільнорадикальних процесів з наступним ушкодженням комплексів дихального ланцюга та порушенням його функціонування за умов гіперглікемії призводить до менш ефективного виробництва АТФ і компенсаторного збільшення метаболічного потоку глюкози з активацією ензимів циклу Кребса, що розглядається як основна метаболічна аномалія в корі нирок при цукровому діабеті (Sas et al., 2016). При цьому таке метаболічне перепрограмування може призвести до специфічних змін функціонування мітохондрій та сприяти прогресуванню захворювань нирок.

Як можливі механізми дисметаболических порушень у нирках за таких умов розглядають підвищене утворення інтермедіатів циклу Кребса, зокрема сукцинату та фумарату, які, зв'язуючись з відповідними рецепторами, здатні індукувати каскади перетворень, наслідком яких будуть ушкодження нирок (Lee et al., 2013; You et al., 2016). Окрім того, за гіперглікемії спостерігається посилене фосфорилування фактора транскрипції FoxO3 та ацетилювання ензимів циклу Кребса, що у свою чергу призводить до їх активації (Kosanam et al., 2014).



**Рис. 2.** *α-кетоглутаратдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок щурів за різної забезпеченості раціону сахарозою та протеїном*

**Fig. 2.** *The α-ketoglutarate dehydrogenase activity in kidney cell mitochondria from rats that received diets with different contents of sucrose and protein*



**Рис. 3.** *Малатдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок щурів за різної забезпеченості раціону сахарозою та протеїном*

**Fig. 3.** *The malate dehydrogenase activity in kidney cell mitochondria from rats that received diets with different contents of sucrose and protein*

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що активація  $NAD^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса за умов споживання високосахарозного раціону може розглядатися як одна з можливих ланок механізму ушкодження

нирок та надалі дозволить біохімічно обґрунтувати підходи до корекції нефротичних ускладнень за нутрієнтного дисбалансу.

## Список літератури / References:

1. Amorim R.G., Guedes G.D.S., Vasconcelos S.M.L., Santos J.C.F. Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. *Arq Bras Cardiol.* 2019; 112(5): 577-587. doi: 10.5935/abc.20190077.
2. Bhatia D., Capili A., Choi M.E. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: Potential therapeutic approaches. *Kidney Res Clin Pract.* 2020;39(3): 244-258. doi: 10.23876/j.krcp.20.082.
3. Braga P.C., Alves M.G., Rodrigues A.S., Oliveira P.F. Mitochondrial Pathophysiology on Chronic Kidney Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 1776. <https://doi.org/10.3390/ijms23031776>.
4. Cetica P., Pintos L., Dalvit G., Beconi M. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction.* 2003; 126(6): 753-763. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260753>.
5. Clark A.J., Parikh S.M. Targeting energy pathways in kidney disease: the roles of sirtuins, AMPK, and PGC1 $\alpha$ . *Kidney Int.* 2021; 99(4): 828-840. doi: 10.1016/j.kint.2020.09.037.
6. Engham S., Mdaki K., Jewell K., Austin R., Lehner A.N., Langley-Evans S.C. Mitochondrial respiration is decreased in rat kidney following fetal exposure to a maternal low-protein diet. *J Nutr Metab.* 2012; 2012: 1-10. doi: 10.1155/2012/989037.
7. Forbes J.M. Mitochondria-Power Players in Kidney Function? *Trends Endocrinol Metab.* 2016; 27(7): 441-442. doi: 10.1016/j.tem.2016.05.002.
8. Fotheringham A.K., Solon-Biet S.M., Bielefeldt-Ohmman H., McCarthy D.A., McMahon A.C., Ruohonen K., Li I., Sullivan M.A., Whiddett R.O., Borg D.J., Cogger V.C., Ballar W.O., Turner N., Melvin R.G., Raubenheimer D., Le Couteur D.G., Simpson S.J., Forbes J.M. Kidney disease risk factors do not explain impacts of low dietary protein on kidney function and structure. *iScience.* 2021; 24(11): 103308. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103308>.
9. Galvan D.L., Green N.H., Danesh F.R. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017; 92(5): 1051-1057. doi: 10.1016/j.kint.2017.05.034.
10. Guo L., Chen S., Ou L., Li S., Ye Z.N., Liu H.F. Disrupted Alpha-Ketoglutarate Homeostasis: Understanding Kidney Diseases from the View of Metabolism and Beyond. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2022; 15: 1961-1974 <https://doi.org/10.2147/DMSO.S369090>
11. Hallan S., Sharma K. The role of mitochondria in diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 2016; 16(7): 61. doi: 10.1007/s11892-016-0748-0.
12. Hasegawa S., Tanaka T., Saito T., Fukui K., Wakashima T., Susaki E.A., Ueda H.R., Nangaku M. The oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor enarodustat counteracts alterations in renal energy metabolism in the early stages of diabetic kidney disease. *Kidney Int.* 2020; 97(5): 934-950. doi: 10.1016/j.kint.2019.12.007.
13. Huang Y.C., Soundar S., Colman R.F. Affinity cleavage at the divalent metal site of porcine NAD-specific isocitrate dehydrogenase. *Protein Sci.* 2000; 9(1): 104-111. doi: 10.1110/ps.9.1.104.
14. Itoh H., Komatsuda A., Ohtani H., Wakui H., Imai H., Sawada K., Otaka M., Ogura M., Suzuki A., Hamada F. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur J Biochem.* 2002; 269(23): 5931-5938. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03317.x.
15. Kiss G., Konrad C., Doczi J., Starkov A.A., Kawamata H., Manfredi G., Zhang S.F., Gibson G.E., Beal M.F., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. The negative impact of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J.* 2013; 27(6): 2392-406. doi: 10.1096/fj.12-220202.
16. Kosanam H., Thai K., Zhang Y., Advani A., Connelly K.A., Diamandis E.P., Gilbert R.E. Diabetes induces lysine acetylation of intermediary metabolism enzymes in the kidney. *Diabetes.* 2014; 63(7): 2432-2439. doi: 10.2337/db12-1770.
17. Lee D.Y., Wauquier F., Eid A.A., Roman L.J., Ghosh-Choudhury G., Khazim K., Block K., Gorin Y. Nox4 NADPH oxidase mediates peroxynitrite-dependent uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase and fibronectin expression in response to angiotensin II: role of mitochondrial reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2013; 288(40): 28668-86. doi: 10.1074/jbc.M113.470971.
18. Liu X., Du H., Sun Y., Shao L. Role of abnormal energy metabolism in the progression of chronic kidney disease and drug intervention. *Ren Fail.* 2022; 44(1): 790-805. doi: 10.1080/0886022X.2022.2072743.
19. Mahajan M.S., Upasani C.D., Upaganlawar A.B., Gulecha V.S. Renoprotective effect of co-enzyme Q10 and N-acetylcysteine on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Int J Diabetes Clin Res.* 2020; 7(2): 123. doi: 10.23937/2377-3634/1410123.
20. Mariño G., Pietrocola F., Kong Y., Eisenberg T., Hill J.A., Madeo F., Kroemer G. Dimethyl  $\alpha$ -ketoglutarate inhibits maladaptive autophagy in pressure overload-induced cardiomyopathy. *Autophagy.* 2014; 10(5): 930-2. doi: 10.4161/auto.28235.
21. Mise K., Galvan D.L., Danesh F.R. Shaping up mitochondria in diabetic nephropathy. *Kidney360.* 2020; 1(9): 982-992. doi: <https://doi.org/10.34067/KID.0002352020>.
22. Mullen A.R., Wheaton W.W., Jin E.S., Chen P.H., Sullivan L.B., Cheng T., Yang Y., Linehan W.M., Chandel N.S., DeBerardinis R.J. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature.* 2011; 481 (7381): 385-8. doi: 10.1038/nature10642.
23. Muoio D.M. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell.* 2014; 159(6): 1253-62. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.034.
24. Ruiz-Ramírez A., Barrios-Maya M., Quezada-Pablo H., López-Acosta O., El-Hafidi M. Kidney dysfunction induced by a sucrose-rich diet in rat involves mitochondria ROS generation, cardiolipin changes, and the decline of autophagy protein

- markers. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020; 318(1): F53-F66. doi: 10.1152/ajprenal.00208.2019.
25. Sas K.M., Kayampilly P., Byun J., Nair V., Hinder L.M., Hur J., Zhang H., Lin C., Qi N.R., Michailidis G., Groop P.H., Nelson R.G., Darshi M., Sharma K., Schelling J.R., Sedor J.R., Pop-Busui R., Weinberg J.M., Soleimanpour S.A., Abcouwer S.F., Gardner T.W., Burant C.F., Feldman E.L., Kretzler M., Brosius F.C. 3rd, Pennathur S. Tissue-specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. *JCI Insight.* 2016; 1(15): e86976. doi: 10.1172/jci.insight.86976.
  26. Smith R.L., Soeters M.R., Wüst R.C.I., Houtkooper R.H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev.* 2018; 39(4): 489-517. doi: 10.1210/er.2017-00211.
  27. Tokonami N., Morla L., Centeno G., Mordasini D., Ramakrishnan S.K., Nikolaeva S., Wagner C.A., Bonny O., Houillier P., Doucet A., Firsov D. Alpha-ketoglutarate regulates acid-base balance through an intrarenal paracrine mechanism. *J Clin Invest.* 2013; 123(7): 3166-3171. doi:10.1172/JCI67562.
  28. Voloshchuk O.M., Kopylchuk G.P. Indicators of the energy supply system in the liver of rats under the conditions of different nutrients content in a diet. *Biopolymers and Cell.* 2021; 37 (3): 259-269. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A58>
  29. Wilding J.P. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. *Metabolism.* 2014; 63(10): 1228-37. doi: 10.1016/j.metabol.2014.06.018.
  30. Wu N., Yang M., Gaur U., Xu H., Yao Y., Li D. Alpha-ketoglutarate: physiological functions and applications. *Biomol Ther (Seoul).* 2016; 24(1): 1-8. doi:10.4062/biomolther.2015.078.
  31. You Y.H., Quach .T, Saito R., Pham J., Sharma K. Metabolomics Reveals a Key Role for Fumarate in Mediating the Effects of NADPH Oxidase 4 in Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27(2): 466-81. doi: 10.1681/ASN.2015030302.

## **ACTIVITY OF KIDNEY MITOCHONDRIAL NAD<sup>+</sup>-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN RATS UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT NUTRIENT SUPPLY**

**O. M. Voloshchuk, A. S. Boychuk**

*The aim of this work was to evaluate the activity NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of Krebs cycle in kidney of rats under the conditions of different sucrose and protein content in a diet. The activity of isocitrate dehydrogenase was evaluated based on the amount of accumulated NADH during conversion of isocitrate to  $\alpha$ -ketoglutarate. The activity of malate dehydrogenase was determined from NADH accumulation in reaction of malate oxidation, at  $\lambda = 340$  nm. The activity of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase was measured by intensity of  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation, spectrophotometrically at  $\lambda = 417$  nm. The animals were divided into the following experimental groups: I – control group (C); II – animals receiving low-protein ration (LP); III – animals receiving high-sucrose diet (HS); IV – animals receiving low-protein high-sucrose diet (LP/HS). It has been shown, that by rats group kept on a low-protein diet isocitrate dehydrogenase activity was increased, without any significantly compared changes in  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities. A similar tendency is typical for animals maintained on a low-protein/high-sucrose diet. At the same time isocitrate dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities exceeded control values in group of animals feeded by high-sucrose diet the most. From results we got, it can be concluded, that activation of NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of Krebs cycle in mitochondrial kidney fraction of rats received a high-sucrose diet can be considered as one of possible links in mechanism of kidney injury progression. Our finding allows to substantiate the approaches for kidney complications treatment biochemically under nutrient imbalance.*

*Keywords: nutrients, kidney, mitochondria, isocitrate dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase.*

*Отримано редколегією 12.04.2022 р.*