

Влияние гепарина и этанола на активность лактатдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс

Хомутов А.Е.¹, Лизунова А.С.²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Effect of heparin and ethanol on the activity of lactate dehydrogenase in mitochondrial and cytoplasmic rat liver cell fractions

Khomutov A.E.¹, Lizunova A.S.²

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

²Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov

АННОТАЦИЯ

В опытах на крысах показано, что этанол в дозе 4.5 г/кг приводит к повышению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) клеток печени крыс в прямой реакции в субклеточных фракциях. В цитоплазматической фракции активность ЛДГ в обратной реакции снижалась. Предварительное введение животным гепарина в дозе 250 МЕ/кг частично нивелирует эффекты внутрибрюшинного введения этанола, что выражается в снижении активности ЛДГ клеток печени крыс в прямой реакции в субклеточных фракциях. Связывание эндогенного гепарина протамином сульфатом и последующее введение этанола приводит к увеличению активности ЛДГ в митохондриальной фракции клеток печени крыс.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, субклеточные фракции печени, этанол, гепарин, протамин сульфат.

ABSTRACT

Experiments on rats have shown that ethanol at a dose of 4.5 g/kg leads to an increase in the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in rat liver cells in a direct reaction in subcellular fractions. In the cytoplasmic fraction, the LDH activity in the reverse reaction decreased. Pre-administration of heparin to animals at a dose of 250 IU/kg partially neutralizes the effects of intraperitoneal administration of ethanol, which is expressed in a decrease in the activity of LDH in rat liver cells in a direct reaction in subcellular fractions. Binding of endogenous heparin to protamine sulfate and subsequent administration of ethanol leads to an increase in LDH activity in the mitochondrial fraction of rat liver cells.

Keywords: lactate dehydrogenase, subcellular fractions of the liver, ethanol, heparin, protamine sulfate.

ВВЕДЕНИЕ

Находясь на развилке путей метаболизма углеводов, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) участвует в регуляции тонко сбалансированного катаболиз-

INTRODUCTION

Being at the fork in the pathways of carbohydrate metabolism, lactate dehydrogenase (LDH) is involved in the regulation of finely balanced catabo-

Поступила 20.05.2020
Принята 05.06.2020

*Автор, ответственный за переписку
Лизунова Алла Сергеевна: ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9.
E-mail: lizunova-alla@mail.ru

Received 20.05.2020
Accepted 05.06.2020

*Corresponding author
Lizunova Alla Sergeevna: Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, 9, Vysokovolt'naya str., 390026, Ryazan, Russia.
E-mail: lizunova-alla@mail.ru

ма и анаболизма, анаэробного и аэробного гликолиза, а также играет немаловажную роль в процессах клеточного ацидоза, апоптоза, роста и генерирования рекомбинантных белков. Лактат можно рассматривать как определенный тканевой резерв активно метаболизирующегося пирувата. Обратимость лактатдегидрогеназной реакции и высокая активность фермента позволяют паре субстратов лактат — пируват играть важную роль в контроле над отношением окисленных и восстановленных форм никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в клетке [1].

Лактатдегидрогеназа (L-лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза, код фермента (КФ) 1.1.1.27) катализирует реакцию:



Существенным в возможной способности ЛДГ к изменению направления потоков пирувата является обнаруженная у этого фермента саморегуляция — ингибирование избытком субстрата (пирувата) [2]. Субстратное ингибирование, в свою очередь, подвержено внешним регуляторным воздействиям. Нивелируют субстратное ингибирование лактатдегидрогеназы также некоторые аналоги субстрата. Возможно, что в процессе ингибирования участвуют различные конформеры ЛДГ, обладающие разным сродством к субстрату — ингибитору [3].

В работе Сугробовой с соавт. было показано, что добавление F-актина вызывает снижение активности ЛДГ, что сопровождается ухудшением ее каталитических характеристик [4]. Присоединение ЛДГ к актину приводит к активации Mg²⁺-АТФазы актиномиозина на 30 %. Возможно взаимодействие ЛДГ не только с F-актином, но и тубулином, микротубулином и другими белками цитоскелета клетки [2]. Предполагается, что обратимая адсорбция ферментов гликолиза, в том числе ЛДГ, на структурных компонентах клетки является одним из важнейших механизмов регуляции метаболизма благодаря упорядоченности, компартиментализации метаболических процессов [5]. Взаимодействие ЛДГ с белками и полиэлектролитами приводит к образованию комплексов, которые, изменяя равновесие в системе димер — тетрамер, влияют на каталитическую активность фермента [6, 7]. Также возможно обратимое связывание ЛДГ типа В с липосомами, состоящими из кислых фосфолипидов. Этот процесс наиболее эффективно идет при низких значениях рН, близких к изоэлектрической точке белка. В данных условиях сайт связывания кофактора НАДН лактатдегидрогеназы типа В активно участвует во взаимодействии фермента с кислыми фосфолипидами [8].

lism and anabolism, anaerobic and aerobic glycolysis, and also plays an important role in the processes of cellular acidosis, apoptosis, growth and generation of recombinant proteins. Lactate can be considered as a specific tissue reserve of actively metabolized pyruvate. The reversibility of the lactate dehydrogenase reaction and the high activity of the enzyme allow the lactate-pyruvate substrate pair to play an important role in controlling the ratio of oxidized and reduced forms of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in the cell [1].

Lactate dehydrogenase (L-lactate: NAD⁺-oxidoreductase, enzyme code (EC) 1.1.1.27) catalyzes the reaction:



The self-regulation found in this enzyme — inhibition by an excess of the substrate (pyruvate), is essential in the possible ability of LDH to change the direction of pyruvate flows [2]. Substrate inhibition, in turn, is subject to external regulatory influences. Some analogs of the substrate also neutralize the substrate inhibition of lactate dehydrogenase. It is possible that various LDH conformers with different affinity for the substrate-inhibitor participate in the inhibition process [3].

In the work of Sugrobova et al. it was shown that the addition of F-actin causes a decrease in LDH activity, which is accompanied by a deterioration in its catalyst performance [4]. The addition of LDH to actin leads to activation of the Mg²⁺-ATPase of actomyosin by 30%. LDH may interact not only with F-actin, but also with tubulin, microtubulin, and other proteins of the cell cytoskeleton [2]. It is assumed that the reversible adsorption of glycolysis enzymes, including LDH, on cell's structural components is one of the most important mechanisms of metabolic regulation due to the orderliness and compartmentalization of metabolic processes [5]. The interaction of LDH with proteins and polyelectrolytes leads to the formation of complexes which, by changing the equilibrium in the dimer — tetramer system, affect the catalytic activity of the enzyme [6, 7]. Reversible binding of LDH B to liposomes composed of acidic phospholipids is also possible. This process is most efficient at low pH values, close to the isoelectric point of the protein. Under these conditions, the binding site of the NADH cofactor of lactate dehydrogenase B is actively involved in the interaction of the enzyme with acidic phospholipids [8].

We have previously shown that *in vitro* the heparin, upon formation of a complex with a puri-

Ранее нами было показано, что *in vitro* гепарин при образовании комплекса с очищенным препаратом ЛДГ увеличивает активность фермента по двухпараметрически рассогласованному типу активации. Этанол не оказывает влияния на активность очищенного препарата ЛДГ, а этанол при воздействии на комплекс ЛДГ — гепарин активирует лактатдегидрогеназную реакцию по двухпараметрически рассогласованному типу активации [9]. Однако сведения о сочетанном влиянии эндогенного и экзогенного гепарина и этанола *in vivo* имеют фрагментарный характер, в связи с чем была предпринята настоящая работа.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние гепарина и этанола (при сочетанном введении) на активность лактатдегидрогеназы в субклеточных фракциях печени *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы 80 нелинейных крыс-самцов массой 200 ± 15 г, содержащихся в комфортных условиях на общем рационе вивария. Все животные были распределены в 8 групп (описание групп дано в табл. 1, 2) по 10 крыс в каждой. В качестве исследуемых веществ использовались следующие препараты: 1) высокомолекулярный гепарин производства Московского эндокринного завода, содержащий в 1 мл раствора 5000 МЕ (1 МЕ = 0.0077 мг); 2) протамин сульфат производства Московского эндокринного завода, содержащий в 1 мл раствора 10 мг сухого вещества, 3) спирт этиловый ректификат. Исследуемые вещества разводили физиологическим раствором и вводили внутривенно в объёме 1 мл в определенной последовательности, предусмотренной условиями опыта. Время между введениями было постоянным и составляло 10 мин.

Митохондриальную и цитоплазматическую фракции клеток печени экспериментальных животных получали методом дифференциального центрифугирования [10]. Крыс после окончания эксперимента декапитировали. Печень быстро извлекали, отмывали от крови, многократно перфузируя ее охлажденным физиологическим раствором с помощью толстой иглы и шприца объемом 10 мл. Промытую печень помещали на стоящую на льду чашку Петри и измельчали ножницами, гомогенизировали в дистиллированной воде. Затем 10% гомогенат центрифугировали на центрифуге РС-6 при 6000 об./мин в течение 15 мин. Супернатант отделяли от осадка (ядра, не

филированный ЛДГ), увеличивает активность фермента по типу несовпадения двух параметров. Этанол не влияет на активность очищенного ЛДГ, а этанол при воздействии на комплекс ЛДГ — гепарин активирует лактатдегидрогеназную реакцию по типу несовпадения двух параметров [9]. Однако информация о сочетании эндогенного и экзогенного гепарина и этанола *in vivo* фрагментарна, поэтому настоящая работа была проведена.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние гепарина и этанола (при сочетанном введении) на активность лактатдегидрогеназы в субклеточных фракциях печени *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы 80 самцов крыс массой 200 ± 15 г, содержащихся в комфортных условиях на общем рационе вивария. Все животные были разделены на 8 групп (описание групп дано в табл. 1, 2), по 10 животных в каждой. В качестве исследуемых веществ использовались следующие препараты: 1) высокомолекулярный гепарин производства Московского эндокринного завода, содержащий в 1 мл раствора 5000 МЕ (1 МЕ = 0.0077 мг); 2) протамин сульфат производства Московского эндокринного завода, содержащий в 1 мл раствора 10 мг сухого вещества, 3) спирт этиловый ректификат. Исследуемые вещества разводили физиологическим раствором и вводили внутривенно в объёме 1 мл в определенной последовательности, предусмотренной условиями опыта. Время между введениями было постоянным и составляло 10 мин.

Митохондриальную и цитоплазматическую фракции клеток печени экспериментальных животных получали методом дифференциального центрифугирования [10]. После окончания эксперимента крыс декапитировали. Печень быстро извлекали, отмывали от крови, многократно перфузируя ее охлажденным физиологическим раствором с помощью толстой иглы и шприца объемом 10 мл. Промытую печень помещали на стоящую на льду чашку Петри и измельчали ножницами, гомогенизировали в дистиллированной воде. Затем 10% гомогенат центрифугировали на центрифуге РС-6 при 6000 об./мин в течение 15 мин. Супернатант отделяли от осадка (ядра, не

разрушенные клетки) и центрифугировали при скорости 15 000 об./мин в течение 15 мин. Осадок — митохондриальная фракция, супернатант — цитоплазматическая. Активность лактатдегидрогеназы (L-лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) в данных фракциях определяли по методу Кочетова [11] на микроспектрофотометре PowerWave XS (США).

Статистическая обработка результатов была проведена с применением *t*-критерия Стьюдента с использованием программы Primer of Biostatistics [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование активности ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс показало, что внутрибрюшинное введение животным этанола в дозе 4.5 г/кг приводило в основном к повышению активности данного фермента.

В митохондриальной фракции активность ЛДГ в прямой реакции составила 720.7 ± 44.3 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно выше по сравнению с контрольной группой в 1.7 раза; в обратной — 1135.0 ± 80.6 нмоль/мин на 1 мг белка, что также достоверно выше данных контрольной группы в 2.2 раза (табл. 1). В цитоплазматической фракции клеток печени активность фер-

ductase, EC 1.1.1.27) in these fractions was determined using the Kochetov method [11] on a PowerWave XS microspectrophotometer (USA).

Statistical processing of the results was carried out using the Student's *t*-test and the Primer of Biostatistics software [12].

RESULTS AND DISCUSSION

The study of LDH activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of rat liver cells showed that the intraperitoneal administration of ethanol to animals at a dose of 4.5 g/kg led mainly to an increase in this enzyme's activity.

In the mitochondrial fraction, the LDH activity in the direct reaction was 720.7 ± 44.3 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly higher than in the control group by 1.7 times; in the reverse reaction — 1135.0 ± 80.6 nmol/min per 1 mg of protein, which is also significantly higher than the data obtained in the control group by 2.2 times (Table 1). In the cytoplasmic fraction of liver cells, the enzyme activity in the direct reaction was 1330.0 ± 51.2 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly higher than in the control group by 1.9 times. In the reverse reaction, the activity of lactate dehydrogenase decreased and amounted to 800.9 ± 58.2

Таблица 1. Активность ЛДГ (нмоль/мин на 1 мг белка) в митохондриальной фракции клеток печени крыс при введении гепарина, этанола, протамин сульфата и при их совместном действии

Table 1. LDH activity (nmol/min per 1 mg of protein) in the mitochondrial fraction of rat liver cells with the administration of heparin, ethanol, protamine sulfate and in their combined action

Группа / Group	Прямая реакция Direct reaction	Обратная реакция Reverse reaction
Контрольная (интактные животные) / Control (intact animals)	418.1 ± 24.5	509.4 ± 22.9
Гепарин (250 МЕ/кг) / Heparin (250 IU/kg)	374.0 ± 25.6	519.9 ± 20.3
Этанол (4.5 г/кг) / Ethanol (4.5 g/kg)	$720.7 \pm 44.3^*$	$1135.0 \pm 80.6^*$
Гепарин → этанол / Heparin → Ethanol	$622.2 \pm 43.6^{*o}$	$1352.0 \pm 54.3^{*o+}$
Протамин сульфат (10 мг/кг) / Protamine sulfate (10 mg/kg)	399.9 ± 15.1	532.5 ± 24.5
Протамин сульфат → гепарин / Protamine sulfate → Heparin	381.8 ± 19.7	529.2 ± 14.8
Протамин сульфат → этанол / Protamine sulfate → Ethanol	$523.0 \pm 24.6^{*+}$	$617.6 \pm 44.2^{*+}$
Протамин сульфат → гепарин → этанол / Protamine sulfate → Heparin → Ethanol	$670.6 \pm 37.1^{*^{\wedge}}$	$1758.0 \pm 69.9^{*^{\wedge}\#}$

Примечание. Различия между следующими группами статистически значимы:

- * отличие от контрольной группы ($p \leq 0.05$);
- ^o отличие от группы «Гепарин» ($p \leq 0.05$);
- + отличие от группы «Этанол» ($p \leq 0.05$);
- [^] отличие от группы «Протамин сульфат → этанол» ($p \leq 0.05$);
- # отличие от группы «Гепарин → этанол» ($p \leq 0.05$).

Note. The differences between the following groups are statistically significant:

- * difference from the control group ($p \leq 0.05$);
- ^o difference from the Heparin group ($p \leq 0.05$);
- + difference from the Ethanol group ($p \leq 0.05$);
- [^] difference from the Protamine sulfate → Ethanol group ($p \leq 0.05$);
- # difference from the Heparin → Ethanol group ($p \leq 0.05$).

мента в прямой реакции составила 1330.0 ± 51.2 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно выше по сравнению с группой контроля в 1.9 раза. В обратной реакции активность лактатдегидрогеназы уменьшилась и составила 800.9 ± 58.2 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно ниже данных контрольной группы в 1.2 раза (табл. 2).

Введение животным этанола в дозе 4.5 г/кг при предварительном введении гепарина в дозе 250 МЕ/кг приводило к сохранению более высоких значений лактатдегидрогеназной активности в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс по сравнению с контрольной группой. Так, в митохондриальной фракции показатель активности ЛДГ в прямой реакции составил 622.2 ± 43.6 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно выше по сравнению с показателями группы контроля в 1.5 раза; в обратной реакции — 1352.0 ± 54.3 нмоль/мин на 1 мг белка, что также достоверно выше данных контрольной группы в 2.7 раза (см. табл. 1). В цитоплазматической фракции клеток печени активность ЛДГ в прямой реакции составила 1210.0 ± 51.3 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно выше показателей контроля в 1.7 раза. Достоверных отличий по лактатдегидрогеназной активно-

nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly lower than the data of the control group by 1.2 times (Table 2).

Administration of ethanol to animals at a dose of 4.5 g/kg with preliminary administration of heparin at a dose of 250 IU/kg resulted in the preservation of higher values of lactate dehydrogenase activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of rat liver cells compared to the control group. Thus, in the mitochondrial fraction, the index of LDH activity in the direct reaction was 622.2 ± 43.6 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly higher than in the control group by 1.5 times; in the reverse reaction — 1352.0 ± 54.3 nmol/min per 1 mg of protein, which is also significantly higher than the data of the control group by 2.7 times (see Table 1). In the cytoplasmic fraction of liver cells, the LDH activity in the direct reaction was 1210.0 ± 51.3 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly higher than the control values by 1.7 times. There were no significant differences in lactate dehydrogenase activity in the reverse reaction in the cytoplasmic fraction between the Heparin → Ethanol group and the control group (see Table 2).

Таблица 2. Активность ЛДГ (нмоль/мин на 1 мг белка) в цитоплазматической фракции клеток печени крыс при введении гепарина, этанола, протамин сульфата и при их совместном действии

Table 2. LDH activity (nmol/min per 1 mg of protein) in the cytoplasmic fraction of rat liver cells with the administration of heparin, ethanol, protamine sulfate and in their combined action

Группа / Group	Прямая реакция Direct reaction	Обратная реакция Reverse reaction
Контрольная (интактные животные) / Control (intact animals)	692.3 ± 39.2	975.2 ± 55.3
Гепарин (250 МЕ/кг) / Heparin (250 IU/kg)	609.2 ± 34.4	1029.0 ± 20.5
Этанол (4.5 г/кг) / Ethanol (4.5 g/kg)	$1330.0 \pm 51.2^*$	$800.9 \pm 58.2^*$
Гепарин → этанол / Heparin → Ethanol	$1210.0 \pm 51.3^{*o}$	$1090.0 \pm 53.6^+$
Протамин сульфат (10 мг/кг) / Protamine sulfate (10 mg/kg)	618.2 ± 22.7	1039.0 ± 35.0
Протамин сульфат → гепарин / Protamine sulfate → Heparin	625.0 ± 27.9	1044.0 ± 24.3
Протамин сульфат → этанол / Protamine sulfate → Ethanol	$1391.0 \pm 65.1^*$	857.1 ± 58.2
Протамин сульфат → гепарин → этанол / Protamine sulfate → Heparin → Ethanol	$1213.0 \pm 53.2^*$	$319.1 \pm 24.1^{*+^{\wedge}\#}$

Примечание. Различия между следующими группами статистически значимы:

- * отличие от контрольной группы ($p \leq 0.05$);
- o отличие от группы «Гепарин» ($p \leq 0.05$);
- + отличие от группы «Этанол» ($p \leq 0.05$);
- ^ отличие от группы «Протамин сульфат → этанол» ($p \leq 0.05$);
- # отличие от группы «Гепарин → этанол» ($p \leq 0.05$).

Note. The differences between the following groups are statistically significant:

- * difference from the control group ($p \leq 0.05$);
- o difference from the Heparin group ($p \leq 0.05$);
- + difference from the Ethanol group ($p \leq 0.05$);
- ^ difference from the Protamine sulfate → Ethanol group ($p \leq 0.05$);
- # difference from the Heparin → Ethanol group ($p \leq 0.05$).

сти в обратной реакции в цитоплазматической фракции между группой «Гепарин → этанол» и контрольной не обнаружено (см. табл. 2).

Кроме того, предварительное введение животным гепарина в дозе 250 МЕ/кг приводило к сохранению более высоких значений активности ЛДГ в обратной реакции в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс в группе «Гепарин → этанол» по сравнению с группой, которой вводился этанол. В митохондриальной фракции показатель активности ЛДГ был достоверно выше данных группы «Этанол» в 1.2 раза (см. табл. 1), в цитоплазматической фракции — достоверно выше данных группы «Этанол» в 1.4 раза (см. табл. 2).

Следующим этапом исследований стало изучение роли эндогенного гепарина в защите организма от экзогенного этанола. Для этого крысам вводился этанол через 10 мин после внутрибрюшинного введения антагониста гепарина — протамин сульфата в дозе 10 мг/кг. Внутрибрюшинное введение крысам этанола при предварительном связывании эндогенного гепарина протамин сульфатом приводило к снижению лактатдегидрогеназной активности в митохондриальной фракции клеток печени по сравнению с группой «Этанол». Так, в этой группе активность фермента в прямой реакции составила 523.0 ± 24.6 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно ниже данных группы «Этанол» в 1.4 раза; в обратной реакции — 617.6 ± 44.2 нмоль/мин на 1 мг белка, что также достоверно ниже по сравнению с группой «Этанол» в 1.8 раза (см. табл. 1). Достоверных отличий по активности фермента в цитоплазматической фракции между группами «Этанол» и «Протамин сульфат → этанол» обнаружено не было (см. табл. 2).

Кроме того, введение крысам этанола при действии протамин сульфата приводило к повышению активности ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени по сравнению с группой контроля. В митохондриальной фракции активность фермента в прямой реакции была достоверно выше данных контрольной группы в 1.3 раза; в обратной реакции — в 1.2 раза (см. табл. 1). В цитоплазматической фракции клеток печени активность ЛДГ в прямой реакции была достоверно выше по сравнению с группой контроля в 2 раза (см. табл. 2).

Дальнейший этап исследований включал эксперимент, при котором крысам предварительно внутрибрюшинно вводился протамин сульфат в дозе 10 мг/кг, затем через 10 мин также внутрибрюшинно — гепарин в дозе 250 МЕ/кг, а еще через

In addition, preliminary administration of heparin to animals at a dose of 250 IU/kg led to the preservation of higher values of LDH activity in the reverse reaction in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of rat liver cells in the Heparin → Ethanol group compared to the Ethanol group. In the mitochondrial fraction, the LDH activity index was significantly higher than the data of the Ethanol group by 1.2 times (see Table 1), in the cytoplasmic fraction — significantly higher than the data of the Ethanol group by 1.4 times (see Table 2).

The next stage of research was the study of the endogenous heparin role in protecting the body from exogenous ethanol. For this purpose, the rats were injected with ethanol 10 min after the intraperitoneal injection of the heparin antagonist — protamine sulfate at a dose of 10 mg/kg. Intraperitoneal administration of ethanol to rats with preliminary binding of endogenous heparin to protamine sulfate led to a decrease in lactate dehydrogenase activity in the mitochondrial fraction of liver cells compared to the Ethanol group. Thus, in this group, the enzyme activity in the direct reaction was 523.0 ± 24.6 nmol/min per 1 mg of protein, which is 1.4 times lower than in the Ethanol group; in the reverse reaction — 617.6 ± 44.2 nmol/min per 1 mg of protein, which is also significantly lower in comparison with the Ethanol group by 1.8 times (see Table 1). There were no significant differences in enzyme activity in the cytoplasmic fraction between the Ethanol and Protamine sulfate → Ethanol groups (see Table 2).

In addition, the administration of ethanol to rats under the action of protamine sulfate led to an increase in LDH activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of liver cells compared to the control group. In the mitochondrial fraction, the enzyme activity in the direct reaction was significantly higher than that of the control group by 1.3 times; in the reverse reaction — by 1.2 times (see Table 1). In the cytoplasmic fraction of liver cells, the LDH activity in the direct reaction was significantly higher than in the control group by 2 times (see Table 2).

The next stage of the study included an experiment in which rats were preliminarily intraperitoneally injected with protamine sulfate at a dose of 10 mg/kg, then after 10 min also intraperitoneally — heparin at a dose of 250 IU/kg, and after another 10 min — ethanol at a dose of 4.5 mg/kg. The assessment of lactate dehydrogenase activity in this

10 мин — этанол в дозе 4.5 мг/кг. Определение лактатдегидрогеназной активности в данной серии показало, что она в митохондриальной фракции клеток печени была выше, а в цитоплазматической — ниже по сравнению с группой «Протамин сульфат → этанол». В митохондриальной фракции активность фермента в прямой реакции составила 670.6 ± 37.1 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно выше по сравнению с группой «Протамин сульфат → этанол» в 1.3 раза; в обратной реакции — 1758.0 ± 69.9 нмоль/мин на 1 мг белка, что также достоверно выше данных группы «Протамин сульфат → этанол» в 2.8 раза (см. табл. 1). В цитоплазматической фракции клеток печени активность фермента в прямой реакции составила 1213.0 ± 53.2 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно ниже по сравнению с группой «Протамин сульфат → этанол» в 1.1 раза; в обратной реакции — 319.1 ± 24.1 нмоль/мин на 1 мг белка, что достоверно ниже данных группы «Протамин сульфат → этанол» в 2.7 раза (см. табл. 2).

Достоверные отличия активности ЛДГ в группе «Протамин сульфат → гепарин → этанол» от группы «Этанол» наблюдались только в обратной реакции в субклеточных фракциях. В митохондриальной фракции активность фермента была достоверно выше в 1.5 раза (см. табл. 1), в цитоплазматической — достоверно ниже данных группы «Этанол» в 2.5 раза (см. табл. 2).

Предварительное введение гепарина и протамин сульфата в наших опытах с этанолом достоверно изменяло активность ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс. В связи с этим возникает вопрос: не могут ли гепарин и протамин сульфат самостоятельно оказывать влияние на активность исследуемых ферментов? Для ответа на данный вопрос нами было проведено исследование ферментативной активности в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени двух групп крыс, одной из которых вводили гепарин в дозе 250 МЕ/кг, а другой — протамин сульфат в дозе 10 мг/кг. Достоверных изменений активности лактатдегидрогеназы не выявлено (см. табл. 1, 2).

Исследование влияния этанола, гепарина и протамин сульфата на изменение активности ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс выявило следующие закономерности регуляторного действия данных веществ. Гепарин, протамин сульфат, а также совместное их введение не вызывали изменений активности ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени.

series showed that it was higher in the mitochondrial fraction of liver cells, and lower in the cytoplasmic fraction compared to the Protamine sulfate → Ethanol group. In the mitochondrial fraction, the enzyme activity in the direct reaction was 670.6 ± 37.1 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly higher than in the Protamine sulfate → Ethanol group by 1.3 times; in the reverse reaction — 1758.0 ± 69.9 nmol/min per 1 mg of protein, which is also significantly higher than in the Protamine sulfate → Ethanol group by 2.8 times (see Table 1). In the cytoplasmic fraction of liver cells, the enzyme activity in the direct reaction was 1213.0 ± 53.2 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly lower than in the Protamine sulfate → Ethanol group by 1.1 times; in the reverse reaction — 319.1 ± 24.1 nmol/min per 1 mg of protein, which is significantly lower than in the Protamine sulfate → Ethanol group by 2.7 times (see Table 2).

Significant differences in LDH activity in the Protamine sulfate → Heparin → Ethanol group from the Ethanol group were observed only in the reverse reaction in subcellular fractions. In the mitochondrial fraction, the enzyme activity was significantly higher by 1.5 times (see Table 1), in the cytoplasmic fraction, it was significantly lower than the data of the Ethanol group by 2.5 times (see Table 2).

Prior administration of heparin and protamine sulfate in our experiments with ethanol significantly changed the LDH activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of rat liver cells. This raises the question: can heparin and protamine sulfate independently affect the activity of the studied enzymes? To answer this question, we evaluated the enzymatic activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of liver cells of two groups of rats, one of which was injected with heparin at a dose of 250 IU/kg, and the other — protamine sulfate at a dose of 10 mg/kg. No significant changes in the activity of lactate dehydrogenase were found (see Tables 1, 2).

The study of the effect of ethanol, heparin, and protamine sulfate on the LDH activity level in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of rat liver cells revealed the following patterns of the regulatory action of these substances. Heparin, protamine sulfate, and their combined administration did not cause changes in the LDH activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of liver cells.

Наиболее сильные изменения активности ЛДГ в прямой реакции в митохондриальной фракции наблюдались при введении этанола и совместном действии протамина сульфата, гепарина и этанола: в этом случае она возростала по сравнению с группой контроля в 1.7 и 1.6 раза соответственно. В обратной реакции активность фермента наиболее сильно изменялась при совместном действии протамина сульфата, гепарина и этанола: в этом случае ее показатели возростали в 3.5 раза по сравнению с контрольной группой (см. табл. 1).

Также изменялись показатели активности ЛДГ в цитоплазматической фракции клеток печени под действием этанола, гепарина и протамина сульфата. Наибольшие изменения активности фермента в прямой реакции наблюдались при совместном введении протамина сульфата и этанола — она возростала в 2 раза; в обратной реакции активность ЛДГ снижалась в 3 раза при совместном действии протамина сульфата, гепарина и этанола (см. табл. 2).

Таким образом, этанол, гепарин и протамин сульфат, а также совместное их введение способно регулировать активность ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс.

Как известно, окисление этанола осуществляется преимущественно в печени, где метаболизируется до 95 % введенного в организм алкоголя, что приводит к изменениям в ферментных системах этого органа [13]. Поиск веществ, в том числе и эндогенной природы, способных нивелировать токсические эффекты больших доз этанола, является одним из важных направлений в наркологии [14]. Одним из возможных кандидатов на эту роль является гепарин. Он обладает широким спектром действия (в том числе связывает и инактивирует токсины) и играет немаловажную роль в поддержании гомеостаза организма [15].

Введение большого количества этанола вызывает запуск стрессорной реакции [16], которая сопровождается увеличением высвобождения гепарина из тучных клеток. Индекс их насыщения гепарином снижается в 4 раза; происходят изменения в микроциркуляции внутренних органов [17].

Исследование активности ЛДГ в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени у интактных животных показало, что в данных фракциях скорость обратной реакции фермента выше скорости прямой реакции, т. е. скорость образования пирувата выше скорости образования лактата. Лактат как источник пирувата важен при нормальной жизнедеятельности организма. Его

The strongest changes in LDH activity in the direct reaction in the mitochondrial fraction was observed with the administration of ethanol and the combined action of protamine sulfate, heparin, and ethanol: in this case, it increased in comparison with the control group by 1.7 and 1.6 times respectively. In the reverse reaction, the activity of the enzyme changed most strongly when protamine sulfate, heparin, and ethanol were combined: in this case, its parameters increased by 3.5 times compared to the control group (see Table 1).

Parameters of LDH activity in the cytoplasmic fraction of liver cells also changed under the influence of ethanol, heparin, and protamine sulfate. The greatest changes in the activity of the enzyme in the direct reaction were observed with the combined action of protamine sulfate and ethanol — it increased by 2 times; in the reverse reaction, the LDH activity decreased by 3 times under the combined action of the above substances (see Table 2).

Thus, ethanol, heparin, and protamine sulfate, as well as their combination, are able to regulate the LDH activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of rat liver cells.

It is known that ethanol is oxidized mainly in the liver, where up to 95% of alcohol introduced into the body is metabolized, which leads to changes in the enzyme systems of this organ [13]. The search for substances, including those of an endogenous nature, that can neutralize the toxic effects of high doses of ethanol, is one of the important directions in narcology [14]. One possible candidate for this role is heparin. It has a wide spectrum of action (including binding and inactivating toxins) and plays an important role in maintaining the body's homeostasis [15].

Large amount of ethanol triggers a stress response [16] which is accompanied by an increase in the release of heparin from mast cells. The index of their saturation with heparin decreases by 4 times; changes in the microcirculation of internal organs ensue [17].

The study of LDH activity in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of liver cells in intact animals showed that in these fractions the enzymatic reverse reaction rate is higher than the direct reaction rate, i.e., the rate of pyruvate formation is higher than the rate of lactate formation. Lactate, as a source of pyruvate, is important for the normal functioning of the body. Its conversion to pyruvate and further use of the latter is a way of lactate uti-

превращение в пируват и дальнейшее использование последнего являются способом утилизации лактата. В печень через кровь лактат поступает из клеток с преобладающим анаэробным способом катаболизма глюкозы (например, эритроцитов) или интенсивно работающих мышц. В печени в ходе лактатдегидрогеназной реакции из лактата образуется пируват, который затем включается в глюконеогенез, а образовавшаяся глюкоза поступает в кровь. Часть пирувата, образованного из лактата, окисляется печенью до CO_2 и H_2O [4].

В нашем исследовании введение этанола вызывало в цитоплазматической фракции резкое увеличение активности ЛДГ в прямой реакции и ее снижению в обратной, что свидетельствует о смещении равновесия в сторону образования лактата. Этанол угнетает глюконеогенез в печени [18]. Этот эффект связан со сменой окислительно-восстановительных процессов, возрастанием соотношений НАДН/НАД и лактат/пируват.

Исходя из данных, полученных нами в экспериментах и представленных в литературе, можно составить следующую гипотетическую схему действия экзогенного этанола в организме. Основная его часть окисляется в печени до ацетальдегида, который впоследствии окислится до ацетата и направится в цикл Кребса. Активное окисление этанола приводит к увеличению отношения НАДН/НАД, что замедляет реакцию окисления лактата, увеличивается соотношение лактат/пируват и снижается скорость глюконеогенеза. В крови возрастает концентрация лактата, это приводит к лактоацидозу [18]. Нарушение структуры мембран митохондрий, вызванное мембранотропным действием этилового спирта и повреждающим действием ацетальдегида на мембраны, приводит к снижению количества мембраносвязанных форм ферментов, в результате чего повышается их активность, а эффективность работы снижается [19].

В митохондриальной и цитоплазматической фракциях активность ЛДГ в прямой реакции снижалась, а в обратной — увеличивалась, что свидетельствует о снижении соотношения лактат/пируват и преимущественном смещении равновесия ферментативной реакции в сторону образования пирувата, т. е. в сторону усиления аэробного гликолиза, поскольку понижение активности фермента приводит к усилению дыхания митохондрий [20]. Видимо, это связано со способностью гепарина образовывать комплексы с ферментами и регуляторными соединениями, а также стабилизировать мембраны митохондрий [21, 22].

Защитная роль гепарина продемонстрирована в опытах с протамина сульфатом как наиболее

лizing. Lactate enters the liver through the blood from cells with a predominantly anaerobic way of glucose catabolism (e.g. erythrocytes) or intensely working muscles. In the liver, during the lactate dehydrogenase reaction pyruvate is formed from lactate and is then included in gluconeogenesis, while the resulting glucose enters the blood. Part of the pyruvate formed from lactate is oxidized by the liver to CO_2 and H_2O [4].

In our study, in the cytoplasmic fraction the introduction of ethanol caused a sharp increase in LDH activity in the direct reaction and its decrease in the reverse, which indicates a shift in equilibrium towards the formation of lactate. Ethanol suppresses gluconeogenesis in the liver [18]. This effect is associated with a shift in oxidation-reduction processes, and increase in the NADH/NAD and lactate/pyruvate ratios.

Based on the data obtained by us in experiments and presented in the literature, it is possible to draw up the following hypothetical scheme for the action of exogenous ethanol in the body. Most of it is oxidized in the liver to acetaldehyde which is subsequently oxidized to acetate and directed to the Krebs cycle. The active oxidation of ethanol leads to an increase in the NADH/NAD ratio, which slows down the lactate oxidation reaction, the lactate/pyruvate ratio increases, and the rate of gluconeogenesis decreases. The concentration of lactate in the blood increases, which leads to lactic acidosis [18]. Damage to the mitochondrial membranes structure caused by membranotropic effect of ethyl alcohol and damaging effect of acetaldehyde leads to a decrease in the number of membrane-bound forms of enzymes, as a result activity of the latter rises, while the efficiency of their work decreases [19].

In the mitochondrial and cytoplasmic fractions, the LDH activity in the direct reaction decreased, and in the reverse reaction increased, which indicates an elevated lactate/pyruvate ratio and a predominant shift in the equilibrium of the enzymatic reaction towards the formation of pyruvate, i.e., towards an aerobic glycolysis, since the decrease in activity enzyme leads to up-regulation of mitochondrial respiration [20]. Apparently, this is due to the ability of heparin to form complexes with enzymes and regulatory compounds, as well as to stabilize mitochondrial membranes [21, 22].

The protective role of heparin was demonstrated in experiments with protamine sulfate as it's cur-

распространенным в настоящее время его антагонистом. В основе механизма антигепаринового действия белков протамина лежит явление комплексообразования, так как протамины являются носителями свободных аминогрупп, с которыми сульфогруппы гепарина активно взаимодействуют [23]. Показано, что внутрибрюшинное введение протамин сульфата в дозе 10 мг/кг инактивирует эндогенный гепарин у крыс [15].

Инактивация эндогенного гепарина протамин сульфатом ведет к изменениям в работе исследуемых ферментативных систем. В митохондриальной фракции активность ЛДГ возрастала, однако в гораздо меньшей степени, чем в группе, которой вводился этанол. Связывание эндогенного гепарина приводит к тому, что активность ферментов не может возрасти в степени, достаточной для нивелирования токсических эффектов экзогенного этанола. В цитоплазматической фракции активность ЛДГ резко возрастала в прямой реакции, что свидетельствует об активном образовании лактата. Таким образом, связывание эндогенного гепарина протамин сульфатом приводит к усилению токсических эффектов, вызванных инъекцией большой дозы этанола. По-видимому, гепарин в нормальных физиологических условиях способен выполнять в организме роль эндогенного антидота токсинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов показано, что внутрибрюшинное введение этанола в дозе 4.5 г/кг приводит к повышению активности лактатдегидрогеназы клеток печени крыс в прямой реакции в субклеточных фракциях. В цитоплазматической фракции активность лактатдегидрогеназы в обратной реакции снижалась. Предварительное введение животным гепарина в дозе 250 МЕ/кг частично тормозит эффекты внутрибрюшинного введения этанола, что выражается в снижении активности лактатдегидрогеназы клеток печени крыс в прямой реакции в субклеточных фракциях. Связывание эндогенного гепарина протамин сульфатом и последующее введение этанола приводит к увеличению активности лактатдегидрогеназы в митохондриальной фракции клеток печени крыс. Введение гепарина в дозе 250 МЕ/кг при предварительном связывании эндогенного гепарина протамин сульфатом частично снижает токсический эффект внутрибрюшинного введения этанола в дозе 4.5 г/кг, что выражается в возрастании активности исследуемых ферментов в обратной реакции в митохондриальной фракции клеток печени крыс и снижении активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции в цитоплазматической фракции.

rently most widespread antagonist. The mechanism of the anti heparin action of protamine proteins is based on the phenomenon of complexation, since protamines are carriers of free amino groups, with which the sulfo groups of heparin actively interact [23]. It has been shown that the intraperitoneal injection of protamine sulfate at a dose of 10 mg/kg inactivates endogenous heparin in rats [15].

Inactivation of endogenous heparin with protamine sulfate results in changes of the studied enzymatic systems functioning. In the mitochondrial fraction, the LDH activity increased, however, to a much lesser extent than in the Ethanol group. The binding of endogenous heparin leads to the fact that the activity of enzymes cannot increase to an extent sufficient to neutralize the toxic effects of exogenous ethanol. In the cytoplasmic fraction, the LDH activity increased sharply in direct reaction, which indicates active formation of lactate. Thus, binding of endogenous heparin with protamine sulfate leads to an enhancement in toxic effects caused by injection of a large dose of ethanol. Apparently, under normal physiological conditions, heparin is able to perform the role of an endogenous antidote to toxins in the body.

CONCLUSION

As a result of the experiments, it was shown that the intraperitoneal administration of ethanol at a dose of 4.5 g/kg leads to an increase in the activity of lactate dehydrogenase in rat liver cells in a direct reaction in subcellular fractions. In the cytoplasmic fraction, the activity of lactate dehydrogenase in the reverse reaction decreased. Preliminary administration of heparin to animals at a dose of 250 IU/kg partially inhibits the effects of intraperitoneal administration of ethanol, which is expressed in a decrease in the activity of lactate dehydrogenase in rat liver cells in a direct reaction in subcellular fractions. The binding of endogenous heparin to protamine sulfate and the subsequent introduction of ethanol leads to an increase in the activity of lactate dehydrogenase in the mitochondrial fraction of rat liver cells. The introduction of heparin at a dose of 250 IU/kg with preliminary binding of endogenous heparin with protamine sulfate partially reduces the toxic effect of intraperitoneal administration of ethanol at a dose of 4.5 g/kg, which is expressed in an increase in the activity of the studied enzymes in the reverse reaction in the mitochondrial fraction of rat liver cells and a decrease in the activity of lactate dehydrogenase in direct reaction in the cytoplasmic fraction.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paventi G., Pizzuto R., Chieppa G., Passarella S. L-lactate metabolism in potato tuber mitochondria // *FEBS J.* 2007. Vol. 274 (6). P. 1459–1469.
2. Knull H.R., Walsn J.L. Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton // *Curr. Top. Cell. Regul.* 1992. Vol. 33. P. 15–30.
3. Сабурова Е.А., Ягодина Л.О. Кинетические исследования механизма снятия субстратного ингибирования ЛДГ анионами и pH // *Биохимия.* 1990. Т. 55, № 10. С. 1819–1825.
4. Сугрובה Н.П., Ерохина Т.Б., Чеботарёва Н.А. Регуляция активности ферментов в адсорбционных ферментных системах. 3. Взаимодействие ЛДГ из мышц свиньи с Ф-актином // *Молекулярная биология.* 1983. Т. 17, № 2. С. 430–435.
5. Sayd T., Mera T., Martin V., Lalille E. Spatial distribution of myosin heavy chain isoforms and lactate dehydrogenase M4 in the limb musculature of two crossbred lambs // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1998. Vol. 120 (1). P. 153–163.
6. Цыганков А.Ю., Моторин Ю.А., Добрушкин А.Е. Образование комплексов ЛДГ с белками и полиэлектролитами. Возможная физиологическая роль // *Биохимия.* 1986. Т. 51, № 4. С. 590–595.
7. Bergman D.A., Winzor D.J. Thermodynamic nonideality in enzyme catalysis. Effect of albumin on the reduction of pyruvate by lactate dehydrogenase // *Eur. J. Biochem.* 1989. Vol. 185 (1). P. 91–97.
8. Terlecki G., Czapińska E., Hotowy K. Ultracentrifugation studies of the location of the site involved in the interaction of pig heart lactate dehydrogenase with acidic phospholipids at low pH. A comparison with the muscle form of the enzyme // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2007. Vol. 12 (3). P. 378–395.
9. Бочкарева А.В., Зимин Ю.В., Хомутов А.Е. Изменение активности лактатдегидрогеназы печени крыс при действии гепарина в условиях *in vitro* // *Вестн. Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского.* 2008. № 5. С. 86–88.
10. Эванс У.Г. Органеллы и мембраны животной клетки // *Биологические мембраны: пер. с англ. М.: Мир, 1990. С. 13–61.*
11. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. 272 с.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с.
13. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Углеводный обмен, печень и алкоголь. Пуццино: НЦБИ, 1988. 149 с.
14. Анохина И.П., Иванец Н.Н., Дробышева В.Я. Основные достижения в области наркологии, токсикологии, алкоголизма // *Вестн. РАМН.* 1998. № 7. С. 29–37.
15. Хомутов А.Е., Дерюгина А.В. Гепаринология: физиолого-биохимические и биомедицинские аспекты: учеб. пособие. Н. Новгород: Нижегородский гос. ун-т, 2019. 620 с.

REFERENCES

1. Paventi G., Pizzuto R., Chieppa G., Passarella S. (2007). L-lactate metabolism in potato tuber mitochondria. *FEBS J.*, 274 (6), 1459–1469.
2. Knull H.R., Walsn J.L. (1992). Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 33, 15–30.
3. Saburova E.A., Yagodina L.O. (1990). Kinetic studies of the mechanism of removing substrate inhibition of LDH by anions and pH. *Biochemistry*, 55 (10), 1819–1825. In Russ.
4. Sugrobova N.P., Erokhina T.B., Chebotareva N.A. (1983). Regulation of enzyme activity in adsorption enzyme systems. 3. Interaction of LDH from pig muscles with f-actin. *Molecular Biology*, 17 (2), 430–435. In Russ.
5. Sayd T., Mera T., Martin V., Lalille E. (1998). Spatial distribution of myosin heavy chain isoforms and lactate dehydrogenase M4 in the limb musculature of two crossbred lambs. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 120 (1), 153–163.
6. Tsygankov A.Yu., Motorin Yu.A., Dobrushkin A.E. (1986). Formation of LDH complexes with proteins and polyelectrolytes. Possible physiological role. *Biochemistry*, 51 (4), 590–595. In Russ.
7. Bergman D.A., Winzor D.J. (1989). Thermodynamic nonideality in enzyme catalysis. Effect of albumin on the reduction of pyruvate by lactate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 185 (1), 91–97.
8. Terlecki G., Czapińska E., Hotowy K. (2007). Ultracentrifugation studies of the location of the site involved in the interaction of pig heart lactate dehydrogenase with acidic phospholipids at low pH. A comparison with the muscle form of the enzyme. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 12 (3), 378–395.
9. Bochkareva A.V., Zimin Yu.V., Khomutov A.E. (2008). Changes in the activity of rat liver lactate dehydrogenase under the action of heparin *in vitro*. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod*, 5, 86–88.
10. Evans W.H. (1990). Organelles and membranes of an animal cell. In J.B.C. Findlay (ed.). *Biological Membranes. A practical Approach* (Trans.). Moscow: Mir, pp. 13–61. In Russ.
11. Kochetov G.A. (1980). *Practical Guide to Enzymology*. Moscow: Higher school, 272 p. In Russ.
12. Glantz S. (1999). *Primer of biostatistics* (Yu.A. Danilova: Trans.). Moscow: Praktika, 272 p.
13. Kosenko E.A., Kaminsky Yu.G. (1988). *Carbohydrate Metabolism, Liver and Alcohol*. Pushchino, 149 p. In Russ.
14. Anokhina I.P., Ivanets N.N., Drobysheva V.Ya. (1998). Main advances in studies of drug abuse, toxicomania, alcoholism. *Annals RAMS*, 7, 29–37.
15. Khomutov A.E., Deryugina A.V. (2019). *Heparinology: Physiological, Biochemical and Biomedical Aspects: Textbook*. Nizhni Novgorod, 620 p. In Russ.

16. Tanaka M. Stress and alcohol: research with experimental animals // *Nihon Arucoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. 1998. Vol. 33 (1). P. 31–43.
17. Кондашевская М.В., Кактурский Л.В. Нарушение адаптации при посттравматическом стрессовом расстройстве и его коррекция введением малых доз гепарина в эксперименте // *Клин. и эксперим. морфология*. 2018. № 3. С. 63–68.
18. Heikkonen E., Ylikahri R., Roine R. et al. Effect of alcohol on exercise-induced changes in serum glucose and serum free fatty acids // *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1998. Vol. 22 (2). P. 437–443.
19. Березин И.В., Мартинек К., Хмельницкий Ю.Л. Субстратная специфичность алкогольдегидрогеназы в коллоидном растворе воды в органическом растворителе // *Докл. Академии наук СССР*. 1982. Т. 263, № 3. С. 737–741.
20. Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance // *Cancer Cell*. 2006. Vol. 9 (6). P. 425–434.
21. Орлов А.В., Хомутов А.Е., Зимин Ю.В. и др. Влияние гепарина на сократительную функцию сердца и активность лактатдегидрогеназы кардиомиоцитов после тотальной ишемии // *Ломоносов: материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам*. М.: Изд-во МГУ, 1999. Вып. 3. С. 22–23.
22. Хомутов А.Е., Орлов Б.Н. Физиологическая роль гепарина. Горький: Изд-во Горьковск. гос. ун-та, 1987. 77 с.
23. Исаева И.В., Ковалева С.В., Патрики Е.В. и др. Физико-химические свойства и антигепариновая активность протамина лососевых и осетровых рыб // *Хим.-фармакоц. журн.* 1989. № 6. С. 686–691.
16. Tanaka M. (1998). Stress and alcohol: research with experimental animals. *Nihon Arucoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 33 (1), 31–43.
17. Kondashevskaya M.V., Kaktursky L.V. (2018). Adaptation abnormalities in posttraumatic stress disorder corrected by low dose heparin injection in an experiment. *Clin. and Experiment. Morphology*, 3, 63–68.
18. Heikkonen E., Ylikahri R., Roine R. et al. (1998). Effect of alcohol on exercise-induced changes in serum glucose and serum free fatty acids. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22 (2), 437–443.
19. Berezin I.V., Martinek K., Khmel'nitsky Yu.L. (1982). Substrate specificity of alcohol dehydrogenase in a colloidal solution of water in an organic solvent. *Rep. of the USSR Academy of Sciences*, 263 (3), 737–741. In Russ.
20. Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9 (6), 425–434.
21. Orlov A.V., Khomutov A.E., Zimin Yu.V. et al. (1999). The effect of heparin on the contractile function of the heart and the activity of lactate dehydrogenase of cardiomyocytes after total ischemia. Lomonosov: Proceeding of the International conference of students and postgraduates in fundamental sciences. Moscow, pp. 22–23. In Russ.
22. Khomutov A.E., Orlov B.N. (1987). *The Physiological Role of Heparin*. Gorky, 77 p. In Russ.
23. Isaeva I.V., Kovaleva S.V., Patriki E.V. et al. (1989). Physico-chemical properties and antiheparin activity of protamins of salmon and sturgeon. *Pharmaceutical Chemistry J.*, 6, 686–691. In Russ.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Хомутов Александр Евгеньевич — д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Лизунова Алла Сергеевна — канд. биол. наук, доцент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Образец цитирования: Хомутов А.Е., Лизунова А.С. Влияние гепарина и этанола на активность лактатдегидрогеназы в митохондриальной и цитоплазматической фракциях клеток печени крыс // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020. № 3. С. 27–38.

ABOUT THE AUTHORS

Khomutov Aleksandr Evgenyevich — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod.

Lizunova Alla Sergeevna — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Pharmacognosy, Rязан State Medical University named after academician I.P. Pavlov.

Citation example: Khomutov A.E., Lizunova A.S. (2020). Effect of heparin and ethanol on the activity of lactate dehydrogenase in mitochondrial and cytoplasmic rat liver cell fractions. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 3, 27–38.