

УДК 577.158:611.36+577.164.17

ВЛИЯНИЕ 5-ФОРМИЛТЕТРАГИДРОФОЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМ Р450-ЗАВИСИМОЙ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ГЕПАТОЦИТОВ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

И.П. Сутько

Лаборатория биохимической токсикологии и наркологии
ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»

Исследовалось влияние восстановленной формы фолиевой кислоты 5-формилтетрагидрофолата (лейковорина) на монооксигеназную систему гепатоцитов и биохимические показатели крови крыс при хронической алкогольной интоксикации. Значительное увеличение скорости гидроксилирования анилина и p-нитрофенола, O-деалкилирования этокси- и метоксирезорфуфинов, O-деалкилирования пентоксирезорфуфина указывает на преимущественную активацию у животных, получавших этанол, 2E1, 1A2 и 2B1/2 изоформ цитохрома P450. Лейковорин нормализовывал ксенобиотико-метаболизирующую функцию печени, в первую очередь, активность цитохромов P450 1A2 и 2B1/2, и уменьшал степень выраженности эндогенной интоксикации.

Ключевые слова: 5-формилтетрагидрофолиевая кислота, активность цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы гепатоцитов, хроническая алкогольная интоксикация.

The influence of the reduced form of folic acid – 5-formyltetrahydrofolate (leucovorin) – on the hepatocytes monoxygenase system activity and blood biochemical parameters in chronic alcohol intoxication has been studied. Substantial increase in aniline and p-nitrophenol hydroxylases, and ethoxy-, methoxy- and penthoxyresorufin O-dealkylases activities indicates primary induction in animals receiving ethanol, 2E1, 1A2 and 2B1/2 isoforms of cytochrome P450. The obtained results prove that leucovorin have normalized the catalytic activity of cytochrome P450, especially cytochromes P450 1A2 and 2B1/2, and also reduced an endogenous intoxication.

Key words: 5-formyltetrahydrofolate, hepatocytes monoxygenase system activity, chronic alcohol intoxication.

Введение

В основе алкогольного поражения печени лежит способность алкоголя в организме окисляться до ацетальдегида, основного метаболита этанола, который, образуя комплексы с белками, приводит к активации или угнетению ряда ферментов, нарушению репарации ДНК, истощению запасов глутатиона и других внутриклеточных антиоксидантов, разобщению окисления и фосфорилирования со снижением энергопродукции, увеличению интенсивности процессов ПОЛ, стимулированию образования провоспалительных цитокинов и коллагена [16].

Системное окисление этанола в печени включает три метаболических пути, которые могут функционировать параллельно: с использованием алкогольдегидрогеназы, системы митохондриального окисления и каталазы пероксисом [16, 31]. Цитохром P450-зависимая митохондриальная этанолоксилирующая система играет незначительную роль в метаболизме небольших количеств этанола, но активируется при его избытке и приобретает существенное значение при злоупотреблении им [31].

Этанол является субстратом цитохрома P450 и в то же время оказывает влияние на монооксигеназную систему, активируя отдельные изоформы цитохрома P450, главным образом цитохром P450 2E1 [18]. Реакции митохондриального окисления ксенобиотиков и эндогенных субстратов являются важным источником образования свободных радикалов, продукция которых увеличивается при активации митохондриальных монооксигеназ [18, 20]. Если функциональной мощности компонентов антиоксидантной системы оказывается недостаточно, то свободнорадикальные повреждения биомолекул и интенсификация перекисного окисления липидов вносят свой вклад в развитие интоксикации.

В то же время повреждение гепатоцитов, наблюдаю-

щееся в ходе развития патологического процесса в печени, стимулирует регенерацию этого органа. Показано, что ведущую роль в репаративных процессах в печени при остром или хроническом действии агентов различной этиологии играют ДНК-синтетические процессы – пролиферация и полиплоидизация гепатоцитов [3].

Таким образом, фармакологическая коррекция алкогольного поражения печени может осуществляться препаратами, способными влиять на процессы тканевого обмена (витамины), нормализовывать функциональную активность и стимулировать репаративно-регенерационные процессы в печени.

Такой направленностью действия обладает и лейковорин ([6S,R]-5-формилтетрагидрофолат), который представляет собой восстановленную форму фолиевой кислоты, способную вовлекаться в пути одноуглеродного переноса без участия фермента дигидрофолат редуктазы [28, 29].

Регулирующая роль 5-формилтетрагидрофолата в одноуглеродном метаболизме [8, 12, 29], роль запасной формы фолатных коферментов в покоем состоянии жизненного цикла клетки [8, 12], более быстрое его превращение в метилтетрагидрофолиевую кислоту по сравнению с фолиевой кислотой [24], а также антиоксидантные свойства [9, 30] позволяют предположить, что 5-формилтетрагидрофолат может выступать в роли активного эндогенного регулятора обмена веществ в организме, в том числе и цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы гепатоцитов.

Фолаты представляют интерес и в связи с тем, что потребление этанола связано с нарушением всасывания фолиевой кислоты в кишечнике, сниженным поступлением ее в печень и повышенной экскрецией с мочой [27]. Фолатная недостаточность в свою очередь способ-

ствуется нарушению функции печени посредством изменений в метаболизме метионина [14, 27].

Целью данного исследования явилось изучение влияния лейковорина (5-формилтетрагидрофолата) на характер изменения активности монооксигеназной системы гепатоцитов и некоторые биохимические показатели крови крыс при хронической алкогольной интоксикации животных.

Материалы и методы исследований

Опыты были проведены на 48 крысах-самцах линии Wistar массой 130-150 г.

Моделирование хронической алкогольной интоксикации у крыс проводилось согласно Liber C.S., DeCarli L.M. [17]. Животные экспериментальных групп получали *ad libitum* жидкую диету, 36 % энергетической ценности которой обеспечивалось за счет этанола. В контрольной изокалорической диете этанол замещался углеводным компонентом диеты.

Одной из экспериментальных групп животных (группа II) назначался лейковорин (5-формилтетрагидрофолевая кислота) фирмы «Лэнс» (Россия). Лейковорин вводился один раз в сутки, внутривенно, в дозе 17,5 мг/кг. Доза препарата выбрана в соответствии с экспериментальными данными, полученными ранее [4]. Животным контрольной группы и экспериментальной группы I в это же время вводили физиологический раствор внутривенно в дозе 0,3 мл/100 г.

Через 6 недель после начала эксперимента животных декапитировали на фоне эфирного наркоза. Проводили забор крови. Печень промывали охлажденным 1,15% раствором KCL через нижнюю полую вену. Микросомальную фракцию печени выделяли дифференциальным центрифугированием [2]. Готовили 25% гомогенат в 1,15% растворе KCL. Осадок микросом суспендировали в 0,05M трис HCL буфере (pH=7,4) с 1mM ЭДТА и 20% содержанием глицерина. Все манипуляции проводили при +4°C. Микросомальную и цитозольную фракции печени в дальнейшем замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Активность монооксигеназной системы эндоплазматического ретикулаума гепатоцитов *in vitro* оценивали по содержанию цитохромов P450 и b₅, скорости окисления NADPH и NADH, а также по скорости метаболизма этокси-, метокси- и пентоксирезорифурина, p-нитрофенола и анилина в микросомальной фракции печени крыс.

Определение содержания общего цитохрома P450 и b₅ производили по методу T. Omura, R. Sato [22], окисление NADPH (NADH) оценивали по скорости падения оптической плотности NADPH (NADH) в процессе его окисления согласно методу Gillette [11]. Скорости реакций O-деэтилирования 7-этоксирезорифурина, O-деметилирования 7-метоксирезорифурина и O-деалкилирования 7-пентоксирезорифурина определяли по количеству образовавшегося в результате реакции резорифурина [26]. Скорость метаболизма p-нитрофенола оценивали по количеству образовавшегося p-нитрокатехола при 536 нм [15]. Скорость гидроксирования анилина определяли по количеству образовавшегося p-аминофенола [13].

Определение активности трансаминаз, щелочной фосфатазы и γ-глутамилтрансферазы, показателя тимоловой пробы, содержания общего билирубина в сыворотке крови проводили с использованием набора реактивов ООО «Анализ Плюс» и «PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.» (Чехия). Содержание средних молекул определяли методом, основанном на осаждении высокомолекулярных белков плазмы крови действием хлор-

ной кислоты и этилового спирта с последующей фотометрией при 210 нм [1].

Активность дигидрофолатредуктазы в цитозольной фракции печени исследовали спектрофотометрическим методом [23]. В качестве субстрата использовали дигидрофолевую кислоту, синтезированную путем восстановления фолевой кислоты дитионитом натрия [5, 10].

Концентрацию общего белка в микросомальной фракции определяли по методу Lowry [25].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия t Стьюдента. Различия в сравнимых группах считались достоверными при уровне значимости 95 % (p < 0,05).

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного эксперимента показали, что хроническое потребление этанола крысами в течение 6 недель сопровождается повышением содержания общего пула цитохромов P450 и b₅ в микросомальной фракции печени на 39 и 21 %, соответственно. На 43 % увеличивались скорости окисления NADPH и NADH. Повышение содержания общего пула цитохрома P450 сопровождалось увеличением активности 7-этоксирезорифурина O-деэтилазы (цитохром P450 1A1 и 1A2-зависимая реакция) на 38 %, 7-пентоксирезорифурина O-деалкилазы (цитохром P450 2B1/2-зависимая реакция) – на 86 %, анилин p-гидроксилазы (цитохром P450 2E1-зависимая реакция) – на 67 %, p-нитрофенол гидроксилазы (цитохром P450 2E1-зависимая реакция) – на 90 %. В 2 раза по сравнению с контрольной группой увеличивалась активность 7-метоксирезорифурина O-деметилазы (цитохром P450 1A2-зависимая реакция) (таблица 1).

Таблица 1 – Активность цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы печени крыс при хронической алкогольной интоксикации без и на фоне введения лейковорина

Показатели	Контроль	Группа I (этанол+ физ. раствор)	Группа II (этанол+ лейковорин)
Цитохром P450, нмоль/мг белка	0,72 ± 0,06	1,00 ± 0,11* 139 100	0,75 ± 0,06 # 104 75
Цитохром b ₅ , нмоль/мг белка	0,52 ± 0,03	0,63 ± 0,04* 121 100	0,683 ± 0,03* 132 109
Окисление NADPH, нмоль/мин/мг белка	2,53 ± 0,16	3,63 ± 0,31* 144 100	2,93 ± 0,21 116 81
Окисление NADH, нмоль/мин/мг белка	2,03 ± 0,17	2,90 ± 0,24* 143 100	2,50 ± 0,18 123 86
7-Этоксирезорифурина O-деэтилаза, пмоль/мин/мг белка	40,26 ± 4,30	55,72 ± 5,77* 138 100	51,54 ± 3,44 128 92
7-Метоксирезорифурина O-деметилаза, пмоль/мин/мг белка	14,80 ± 1,29	29,76 ± 4,38* 201 100	14,98 ± 1,24 # 101 50
7-Пентоксирезорифурина O-деалкилаза, пмоль/мин/мг белка	6,63 ± 1,53	12,35 ± 2,06* 186 100	7,323 ± 1,30 # 110 59
Анилин p-гидроксилаза, нмоль/мин/мг белка	0,36 ± 0,035	0,60 ± 0,05* 167 100	0,57 ± 0,06* 160 96
p-нитрофенол гидроксилаза, нмоль/мин/мг белка	0,16 ± 0,01	0,30 ± 0,02* 190 100	0,28 ± 0,02* 174 92

Примечание: Над чертой – изменения исследуемых показателей (в %) по отношению к контролю, принятому за 100 %, под чертой – по отношению к I группе. * P < 0,05 по отношению к контролю. # P < 0,05 по отношению к I группе.

Введение лейковорина опытным животным нормализовало содержание общего пула цитохрома P450, скорости окисления NADPH и NADH, активность 7-этокси-, 7-метокси- и 7-пентоксирезорифин О-деалкилаз в микросомальной фракции печени крыс.

Исследование сыворотки крови показало, что у экспериментальных животных, получавших этанол в течение 6 недель, увеличивалась активность АлАТ на 40 %, концентрация общего билирубина возрастала в 2,72 раза, увеличилась степень выраженности эндогенной интоксикации (содержание средних молекул возросло на 24%) (таблица 2). Увеличение показателя тимоловой пробы в этой группе животных в 2,36 раза по сравнению с контролем свидетельствует о наличии воспалительного поражения печени. Уровни активности сывороточных г-глутамилтрансферазы, служащей индикатором алкогольного повреждения печени, и щелочной фосфатазы были повышены, соответственно, на 26 и 24 %.

Таблица 2 – Изменение биохимических показателей сыворотки крови у крыс с хронической алкогольной интоксикацией без и на фоне введения лейковорина

Показатели	Контроль	I группа (этанол+ физ. раствор)	II группа (этанол+ лейковорин)
Активность АлАТ, мккат/л	0,60±0,03	0,84±0,04*	0,79±0,03*
Активность АсАТ, мккат/л	0,90±0,01	0,91±0,03	0,92±0,03
Общий билирубин, мкмоль/л	3,98 ± 0,538	10,83 ± 1,00*	10,50 ± 1,23*
Тимоловая проба, ед. S-H	0,45 ± 0,075	1,06 ± 0,12*	1,08 ± 0,14*
Щелочная фосфатаза, Ед/л	892,10 ± 60,06	1307,00 ± 94,99*	1028,00 ± 59,65 #
γ-глутамил-трансфераза, Ед/л	1,08 ± 0,06	1,36 ± 0,067*	1,16 ± 0,07
Средние молекулы, г/л	1,04 ± 0,04	1,29 ± 0,07*	1,08 ± 0,05 #

Примечание: Над чертой – изменения исследуемых показателей (в %) по отношению к контролю, принятому за 100 %, под чертой – по отношению к I группе. * P < 0,05 по отношению к контролю. # P < 0,05 по отношению к I группе.

Назначение лейковорина животным, подвергающимся хронической алкогольной интоксикации, способствовало нормализации таких биохимических маркеров состояния гепатобилиарной системы, как щелочной фосфатазы и γ-глутамилтрансферазы. Содержание средних молекул в экспериментальной группе, получавшей лейковорин, снижалось до уровня контрольной группы (таблица 2).

Потребление животными этанола в течение 6 недель приводило к снижению активности дигидрофлатредуктазы на 21 % по сравнению с контролем. У животных, получавших лейковорин (группа II), зарегистрировано достоверное увеличение активности данного фермента по сравнению с группой I (рисунок 1).

Таким образом, результаты, полученные в ходе данного экспериментального исследования, подтверждают нарушение функционирования печени при хронической алкогольной интоксикации. Анализ активности цитохром P450-зависимого монооксигеназного комплекса гепатоцитов свидетельствует об активации ферментов первой



Рисунок 1 – Активность дигидрофлатредуктазы в цитозоле печени крыс

Примечание: * P < 0,05 по отношению к контролю. # P < 0,05 по отношению к I группе

фазы метаболизма лекарственных веществ у длительно потреблявших этанол крыс по сравнению с контрольными животными. Значительное увеличение скорости гидроксирования анилина и р-нитрофенола, О-деалкилирования 7-пентоксирезорифина указывает на преимущественную активацию у животных, получавших этанол, соответственно, 2E1, 1A2 и 2B1/2 изоформ цитохрома P450.

В группе животных, получавших лейковорин, содержание общего пула цитохрома P450, скорости окисления NADPH и NADH, активности этоксирезорифин О-деэтилазы (1A1-, 1A2-, 1B1/2-зависимая реакция), метоксирезорифин О-деметилазы (1A2-зависимая реакция) и пентоксирезорифин О-деалкилазы (2B1/2-зависимая реакция) были на уровне контрольной группы. Это свидетельствует о способности лейковорина восстанавливать ксенобиотико-метаболизирующую функцию печени при хронической алкогольной интоксикации, снижая до уровня контроля, в первую очередь, активности 1A2 и 2B1/2 изоформ цитохрома P450. Несмотря на то, что первостепенную роль в метаболизме этанола играет цитохром P450 2E1, показано, что изоформы P450 1A2 и 2B1/2 также метаболизируют этанол в микросомах печени крыс и человека [18, 31].

Гепатозащитное действие лейковорина, о чем свидетельствуют данные биохимического анализа крови животных, вероятно, достигается благодаря важной роли восстановленных форм фолиевой кислоты в переносе одноуглеродных единиц. Так, 5-метилтетрагидрофлат играет важную роль в процессах метилирования, в том числе и метилирования ДНК [19, 28]. Фолатные кофакторы, участвуя в синтезе метионина, обеспечивают необходимый пул метильных радикалов для биосинтеза фосфолипидов [7]. S-аденозилметионин, образующийся из метионина, в свою очередь, регулирует образование восстановленного глутатиона в печени [27] (рисунок 2).

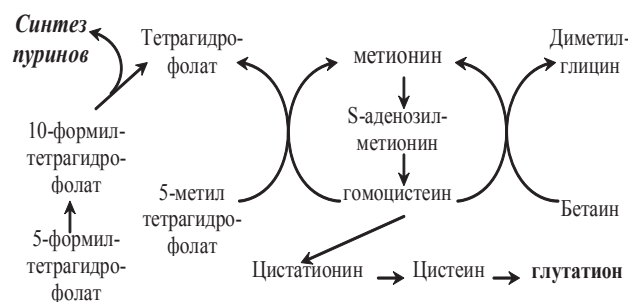


Рисунок 2 – Упрощенная схема метаболизма фолатов в печени

Показан также гепатопротекторный эффект S-аденозилметионина против алкоголь- и цитохром P450 2E1-индуцированного повреждения печени. Установлено, что S-аденозилметионин взаимодействует с цитохромами P450, особенно с цитохромом 2E1, и ингибирует их каталитическую активность при хроническом воздействии алкоголя на организм [6].

Положительное влияние лейковорина на общее функциональное состояние печени может быть связано с антиоксидантными свойствами восстановленных форм фолиевой кислоты [9, 30], а также и с липотропным действием фолатов [3, 21]. Фолаты не только снижают содержание липидов в печени, но также способствуют повышению содержания холина в печени и плазме крови на фоне дефицитного в отношении холина рациона. Фолиевой кислотой можно также устранить жировую инфильтрацию печени, вызываемую избытком ниацина. Липотропный эффект фолатов, вероятно, объясняется участием фолиевых коферментов в переносе метильной группы, а также участием в превращении глицина в серин, который, в свою очередь, используется для образования холина [4].

Заключение

Полученные в ходе экспериментального исследования результаты показали, что лейковорин нормализует ксенобиотико-метаболизирующую функцию печени, в первую очередь, содержание общего цитохрома P450 и активность его изоферментов 1A2 и 2B1/2, и уменьшает степень выраженности эндогенной интоксикации при хронической алкогольной интоксикации крыс. Положительное влияние лейковорина на общее функциональное состояние печени, вероятно, связано с участием восстановленных форм фолатов, в том числе и 5-формилтетрагидрофолиевой кислоты, в реакциях биологического метилирования, их антиоксидантными и липотропными свойствами.

Литература

1. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2000. – Т.1. – 495 с.
2. Карузина, И.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем / И.И. Карузина, А.И. Арчаков // *Современные методы в биохимии* / под общ. ред. В.Н. Ореховича. – М., 1977. – С. 42–78.
3. Подымова, С.Д. *Болезни печени. Руководство для врачей.* / С.Д. Подымова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
4. Сутько, И.П., Мельниченко, Н.Г., Зверинский, И.В. Оценка влияния лейковорина на монооксигеназную систему эндоплазматического ретикулума гепатоцитов крыс без и на фоне введения метотрексата / И.П. Сутько, Н.Г. Мельниченко, И.В. Зверинский // *Вестник ГрГУ им. Я.Купалы. Серия 2.* – 2007. – № 2(52). – С. 116–120.
5. Blakley, R.L. Crystalline dihydropteroylglutamic acid / R.L. Blakley // *Nature.* – 1960. – Vol. 188. – P. 231–232.
6. Cederbaum, A. I. Hepatoprotective effects of S-adenosyl-L-methionine against alcohol- and cytochrome P450 2E1-induced liver injury / A. I. Cederbaum // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16, N 11. – P. 1366–1376.
7. Fidanza, A. Vitamins and lipid metabolism / A. Fidanza, M. Audisio // *Acta Vitaminol. Enzymol.* – 1982. – Vol. 4, № 1–2. – P. 105–114.
8. Field, M.S. Regulation of *de novo* purine biosynthesis by methenyltetrahydrofolate synthetase in neuroblastoma / M.S. Field, D.M.E. Szebenyi, P.J. Stover // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 7. – P. 4215–4221.

9. Free radical scavenging behavior of folic acid: Evidence for possible antioxidant activity / R. Joshi [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2001. – Vol. 30, № 12. – P. 1390–1399.
10. Futterman, S. Enzymatic reduction of folic acid and dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid / S. Futterman // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 228. – P. 1031–1038.
11. Gillete, J.R. The oxidation of drugs by liver microsomes on the role of TPNH and oxygen / J.R. Gillete, B.B. Brodie, B.N. La Du // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1957. – Vol. 119. – P. 523–540.
12. Huang, T. Mechanism for the coupling of ATP hydrolysis to the conversion of 5-formyltetrahydrofolate to 5,10-methenyltetrahydrofolate / T. Huang, V. Schirch // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270, № 38. – P. 22296–22300.
13. Kato, R. Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats / R. Kato, R. Gillette // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1965. – Vol. 150. – P. 279–284.
14. Kharbada, K.K. Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease / K.K. Kharbada // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, N 37. – P. 4947–4954.
15. Koop, D.R. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a / D.R. Koop // *Mol. Pharmacol.* – 1986. – Vol. 29, № 4. – P. 399–404.
16. Lieber, C.S. Metabolism of alcohol / C.S. Lieber // *Clin. Liver Dis.* – 2005. – Vol. 9. – P. 1–35.
17. Lieber, C.S. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update / C.S. Lieber, L.M. DeCarli // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 1982. – Vol. 6, № 4. – P. 523–531.
18. Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism / R.F. Frye [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2006. – Vol. 80. – P. 235–245.
19. Lucock, M. Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes / M. Lucock // *Molecular Genetics and Metabolism.* – 2000. – Vol. 71. – P. 121–138.
20. Lu, Y., Cederbaum, A.I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol / Y. Lu, A.I. Cederbaum // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2008. – Vol. 44. – P. 723–738.
21. Mato, J.M., Martinez-Chantar, M.L., Lu, S.C. Methionine metabolism and liver disease / J.M. Mato, M.L. Martinez-Chantar, S.C. Lu // *Annu. Rev. Nutr.* – 2008. – Vol. 28. – P. 273–293.
22. Omura, T. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties / T. Omura, R. Sato // *J. Biol. Chem.* – 1964. – Vol. 239. – P. 2379–2385.
23. Osborn, M.J. Enzymatic reduction of dihydrofolic acid / M.J. Osborn, F.M. Huenekens // *J. Biol. Chem.* – 1958. – Vol. 233, № 4. – P. 969–974.
24. Pratt, R.F. Foliates in plasma and bile of man after feeding folic acid-³H and 5-formyltetrahydrofolate (folinic acid) / R.F. Pratt, B.A. Cooper // *J. Clin. Invest.* – 1971. – Vol. 50. – P. 455–462.
25. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.N. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
26. Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes / A. Ghosal [et al.] // *Biopharm. Drug Dispos.* – 2003. – Vol. 24. – P. 375–384.
27. Role of s-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium / V. Purohit [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2007. – Vol. 86. – P. 14–24.
28. Stanger, O. Physiology of folic acid in health and disease / O. Stanger // *Curr. Drug Metab.* – 2002. – Vol. 3, № 2. – P. 211–223.
29. Stover, P.J. Physiology of folate and vitamin B₁₂ in health and disease / P.J. Stover // *Nutr. Reviews.* – 2004. – Vol. 62, № 6. – P. 3–13.
30. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore / B.M. Rezk [et al.] // *Febs Letters.* – 2003. – Vol. 555. – P. 601–605.
31. Zakhari, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? / S. Zakhari // *Alcohol Res. Health.* – 2006. – Vol. 29, N 4. – P. 245–254.

Поступила 04.02.2011