

УДК: 616.36-07:619

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.3.108

## ЭЛИМИНАЦИЯ 1,3,7-ТРИМЕТИЛ-КСАНТИНА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИНДУЦИРОВАНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

Попова О. С. \* – к. вет. н., доц. каф. фармакологии и токсикологии (ORCID 0000-0002-0650-0837), Понамарев В.С. – к. вет. н., асс. (ORCID 0000-0002-6852-3110), Кострова А.В. – асп., Агафонова Л.А. – соиск. каф. фармакологии и токсикологии.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет  
ветеринарной медицины»

\*alef\_z@mail.ru

**Ключевые слова:** гепатобилиарная система, клиренс-тест, кофеин, крысы, диагностика, фармакокинетика.

**Keywords:** hepatobiliary system, clearance test, caffeine, rats, diagnostics, pharmacokinetics.

**Благодарности:** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00011, <https://rscf.ru/project/23-26-00011>

Поступила: 10.07.2023

Принята к публикации: 11.09.2023

Опубликована онлайн: 29.09.2023



### РЕФЕРАТ

Патологии печени имеют значительное влияние на клиренс кофеина, что заслуживает серьезного внимания и исследований. В случае наличия патологий печени, процессы метаболизма кофеина существенно видоизменяются, однако, по данным научной литературы, вектор подобных преобразований при конкретных патологиях не определен. Это связано с тем, что гепатопатии снижают активность ферментов, ответственных за метаболизм кофеина. В некоторых случаях может наблюдаться увеличение клиренса кофеина, что связано с временной компенсаторной активацией некоторых ферментов, которые могут участвовать в метаболизме кофеина. Также клиренс кофеина может уменьшаться вследствие снижения метаболической активности печени, что значительно замедлит его окончательную экскрецию. Для определения изменений клиренса 1,3,7-триметил-ксантина наиболее целесообразным является изучение его фармакокинетических параметров, в частности, сравнение его концентрации в сыворотке крови в фазы начального роста, плато и снижения с дальнейшим построением графиков - «кофеиновых кривых». Цель исследования - определение изменения уровней кофеина в сыворотке крови при индуцировании токсического гепатита. Исследования проводились в виварии кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ. С целью моделирования токсического гепатита подопытным животным ежедневно в течение 5 дней внутрижелудочно вводился 35%-ый масляный раствор тетрахлорметана (CCl<sub>4</sub>) в дозировке 1,5 мл/кг [9]. По завершению индуцирования токсический гепатит был подтвержден на основании клинико-биохимических признаков. Спустя сутки после завершения моделирования токсического гепатита у подопытных животных определялись уровни кофеина в сыворотке крови в полном соответствии с предыдущей серией опыта. В результате исследования были построены «кофеиновые» кривые, свидетельствующие об повышенных концентрациях кофеина в сыворотках, увеличения времени элиминации, а также крайне продолжительном плато концентрации кофеина в сыворотке крови при токсическом поражении печени.

## ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Печень является основным органом, обеспечивающим метаболизм 1,3,7-триметил-ксантина (кофеина) у млекопитающих. В процессе элиминации данное соединение проходит через несколько фаз метаболизма, включая окисление, метилирование и глюкуронирование, прежде, чем окончательно выводится из организма.

Патологии печени имеют значительное влияние на клиренс кофеина, что заслуживает серьезного внимания и исследований. В случае наличия патологий печени, процессы метаболизма кофеина существенно видоизменяются, однако, по данным научной литературы, вектор подобных преобразований при конкретных патологиях не определен. Это связано с тем, что гепатопатии снижают активность ферментов, ответственных за метаболизм кофеина. В некоторых случаях может наблюдаться увеличение клиренса кофеина, что связано с временной компенсаторной активацией некоторых ферментов, которые могут участвовать в метаболизме кофеина. Также клиренс кофеина может уменьшаться вследствие снижения метаболической активности печени, что значительно замедлит его окончательную экскрецию.

Для определения изменений клиренса 1,3,7-триметил-ксантина наиболее целесообразным является изучение его фармакокинетических параметров, в частности, сравнение его концентрации в сыворотке крови в фазы начального роста, плато и снижения с дальнейшим построением графиков - «кофеиновых кривых».

Цель исследования - определение изменений уровней кофеина в сыворотке крови при индуцировании токсического гепатита.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHOD

Исследования проводились в виварии кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ.

Для исследования использовались лабораторные животные из предыдущей серии эксперимента с целью дальнейшего

сравнения «кофеиновых кривых» [8]. Количество животных, их возрастные характеристики, живая масса, условия кормления и содержания были эквивалентны [8].

С целью моделирования токсического гепатита подопытным животным ежедневно в течение 5 дней внутривенно вводился 35%-ый масляный раствор тетрахлорметана ( $\text{CCl}_4$ ) в дозировке 1,5 мл/кг [9]. По завершению индуцирования токсический гепатит был подтвержден на основании клинико-биохимических признаков [10]. Исследования были проведены в соответствии принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей, правилами надлежащей лабораторной и клинической (GLP и GCP) практики, а также требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [11,12]. Дизайн исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (протокол №5 от 12.05.2023г).

Спустя сутки после завершения моделирования токсического гепатита у подопытных животных определялись уровни кофеина в сыворотке крови в полном соответствии с предыдущей серией опыта [8].

Математико-статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.1. Рассчитывали среднюю арифметическую ( $M$ ) и ее среднюю ошибку ( $m$ ), расчет достоверности разницы ( $p$ ) по критерию Стьюдента не проводился в связи с поисковым характером исследования и отсутствием групп сравнения [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате эксперимента патологических реакций на введение препарата со стороны сердечно-сосудистой системы отмечено не было, токсическое действие препарата не проявлялось. Уровень кофеина в плазме крови представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Уровень кофеина в плазме крови (в мкг) после введение экзогенного кофеина у подопытных крыс с индуцированным токсическим гепатитом (n=6)**

Вводимая дозировка препарата (в пересчете на чистый кофеин)	50 мг/кг		100 мг/кг		150 мг/кг	
Т после введения / пол животных	♂	♀	♂	♀	♂	♀
30 мин	24,3±0,6	23,4±0,2	68,3±3,2	67,9±4,7	114,5±8,4	112,3±7,1
1 час	21,2±0,3	22,1±0,5	72,1±2,8	70,4±3,2	118,3±7,2	116,1±5,2
2 часа	22,8±0,4	22,4±0,6	82,6±4,1	81,2±3,4	107,9±8,1	108,4±6,3
4 часа	21,3±0,5	21,7±0,1	81,4±3,7	80,7±5,1	108,2±9,4	107,4±4,9
8 часов	19,7±0,3	20,3±0,7	80,3±4,2	80,2±4,3	107,7±8,3	107,2±6,5
12 часов	17,4±0,2	18,3±0,3	59,2±2,5	59,6±5,2	105,2±6,7	106,3±4,1

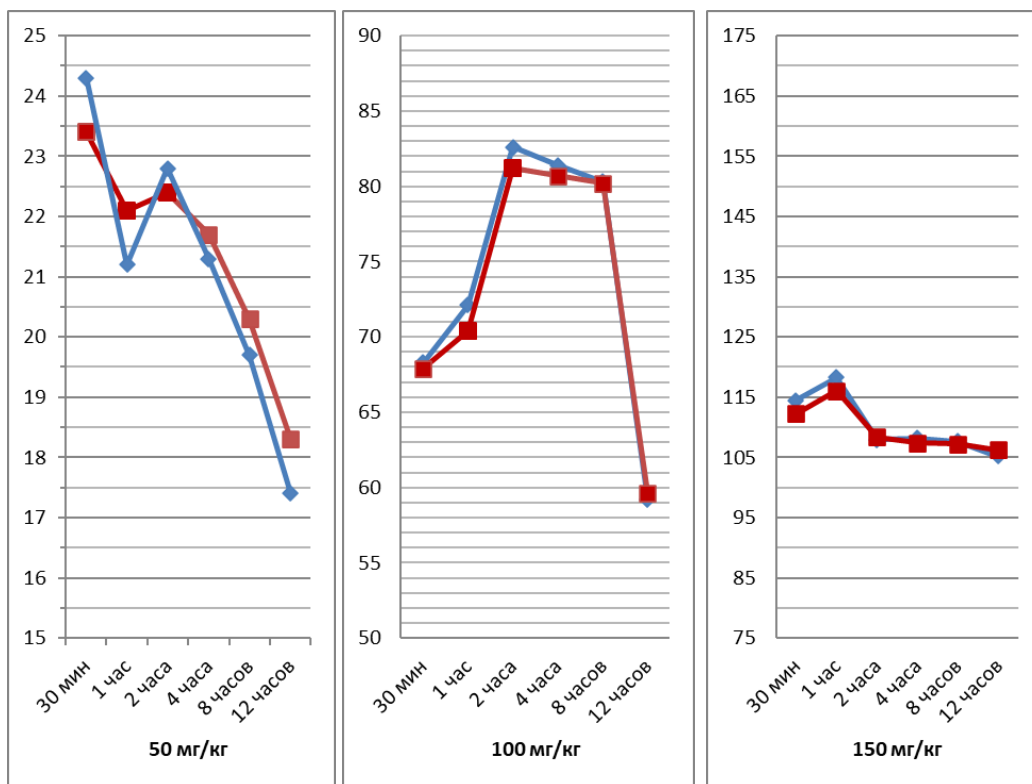


Рис. 1 – Уровень кофеина в плазме крови (в мкг) у самцов (♂) и самок (♀) подопытных крыс с индуцированным токсическим гепатитом после подкожного введения 20% раствора кофеин-натрия бензоата в дозе 50,100 и 150мг/кг.

Проведя анализ полученных данных, мы обнаружили отсутствие какой-либо взаимосвязи между биотрансформацией кофеина у самцов и самок.

Уровни кофеина в сыворотке крови подопытных животных, в целом, значительно выше, чем у животных без патологии, а временной интервал полной элиминации не вошёл в исследуемые временные интервалы [8].

Для установления закономерностей в элиминации кофеина были построены графики изменения его уровней (рис. 1).

При введении животных экзогенного кофеина в дозировке 50 мг/кг отмечались следующие особенности биотрансформации кофеина: кратковременная фаза начального роста концентрации, выход на плато (до 4 часов после введения), а затем планомерное линейное снижение. Полученные данные отличаются от концентраций у тех же животных без индуцированной гепатопатии длительным (около 3 часов) плато и началом значимого снижения уровня только спустя 12 часов после введения, что связано со снижением биотрансформирующих ферментов вследствие альтерации печени.

При введении животным экзогенного кофеина в дозировке 100 мг/кг нами наблюдался резкий рост концентрации спустя 2 часа после введения препарата, затяжное плато (в течение 6 часов) и значительное снижение спустя 12 часов. Полученные данные объясняются снижением биотрансформирующих ферментов вследствие альтерации печени с последующими компенсаторными реакциями.

При введении кофеина в дозировке 150 мг/кг (верхняя граница терапевтической широты применения препарата) всю «кофеиновую кривую» можно охарактеризовать, как плато, так как в исследуемые временные интервалы не были отмечены ни значимые подъёмы, ни значимые снижения уровня концентраций, что свидетельствует о том, что использование данной дозировки при индуцированном поражении печени не компенсируется. Также следует отметить, что у крыс данной группы в ходе эксперимента фикси-

ровался тремор конечностей, являющийся одним из клинических признаков начальных стадий токсического действия кофеина, что позволяет сделать вывод о том, что использование данной концентрации не может быть признано клинически значимым при острых поражениях печени

#### **ВЫВОДЫ / CONCLUSION**

На основании проведенных исследований по определению изменения уровней кофеина в сыворотке крови при индуцировании токсического гепатита раствором тетрахлорметана, мы можем сделать следующие выводы:

Отсутствие какой-либо взаимосвязи между биотрансформацией экзогенного кофеина у самцов и самок.

Уровни кофеина в сыворотке крови подопытных животных, в целом, значительно выше, чем у животных без патологии, а временной интервал полной элиминации не вошёл в исследуемые временные интервалы, предыдущих опытов [8].

Для групп после введения экзогенного кофеина в дозировке 50 мг/кг отмечались: кратковременная фаза начального роста концентрации, выход на плато (до 4 часов после введения), а затем планомерное линейное снижение. При введении животным экзогенного кофеина в дозировке 100 мг/кг нами наблюдался резкий рост концентрации спустя 2 часа после введения препарата, затяжное плато (в течение 6 часов) и значительное снижение спустя 12 часов. При введении кофеина в дозировке 150 мг/кг всю «кофеиновую кривую» можно охарактеризовать, как плато, так как в исследуемые временные интервалы не были отмечены ни значимые подъёмы, ни значимые снижения уровня концентраций, что свидетельствует о том, что использование данной дозировки при индуцированном поражении печени не компенсируется.

#### **ELIMINATION OF 1,3,7-TRIMETHYL-XANTHINE IN LABORATORY ANIMALS WHEN INDUCING TOXIC HEPATITIS.**

**Popova O.S.\*** – Ph.D. of Veterinary Science, Associate Professor Pharmacology and Toxicology (ORCID 0000-0002-0650-

0837), **Ponamarev V.S.** – Ph.D. (ORCID 0000-0002-6852-3110) – ass., Ph.D. of Veterinary Science, **Kostrova A.V.** – graduate student, **Agafonova L.A.** – PhD applicant;

«FSBEI HE St.Petersburg SUVM»

\*alef\_z@mail.ru

**Acknowledgments:** *The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-26-00011, <https://rscf.ru/project/23-26-00011>.*

## ABSTRACT

Liver pathologies have a significant impact on caffeine clearance, which deserves serious attention and research. In the case of liver pathologies, the processes of caffeine metabolism are significantly modified; however, according to the scientific literature, the vector of such transformations for specific pathologies has not been determined. This is due to the fact that hepatopathy reduces the activity of enzymes responsible for caffeine metabolism. In some cases, an increase in caffeine clearance may occur, which is associated with a temporary compensatory activation of certain enzymes that may be involved in caffeine metabolism. Also, the clearance of caffeine may be reduced due to a decrease in the metabolic activity of the liver, which will significantly slow down its final excretion.

To determine changes in the clearance of 1,3,7-trimethylxanthine, the most appropriate is to study its pharmacokinetic parameters, in particular, to compare its concentration in the blood serum in the phases of initial growth, plateau and decline with further construction of graphs - “caffeine curves”.

The purpose of the study was to determine changes in serum caffeine levels during the induction of toxic hepatitis.

The studies were carried out in the vivarium of the Department of Pharmacology and Toxicology of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of St. Petersburg State University of Medicine.

In order to simulate toxic hepatitis, experimental animals were intragastrically injected with a 35% oil solution of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) daily for 5 days at a

dosage of 1.5 ml/kg. Upon completion of induction, toxic hepatitis was confirmed based on clinical and biochemical signs.

A day after the completion of the modeling of toxic hepatitis, the levels of caffeine in the blood serum were determined in the experimental animals in full accordance with the previous series of experiments.

As a result of the study, “caffeine” curves were constructed, indicating increased caffeine concentrations in serum, increased elimination time, as well as an extremely long plateau in the concentration of caffeine in the blood serum during toxic liver damage.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Изучение активности изоферментов цитохрома P450 для прогнозирования межлекарственных взаимодействий лекарственных средств в условиях полипрагмазии / Д. А. Сычев, В. А. Отделенов, Н. П. Денисенко, В. В. Смирнов // Фармакогенетика и фармакогеномика. – 2016. – № 2. – С. 4-11.
2. Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. *Pharmacol Rev.* 2018 Apr;70(2):384-411. doi: 10.1124/pr.117.014407.
3. Culm-Merdek KE, von Moltke LL, Harmatz JS, Greenblatt DJ. Fluvoxamine impairs single-dose caffeine clearance without altering caffeine pharmacodynamics. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Nov;60(5):486-93. doi: 10.1111/j.1365-2125.2005.02467.x.
4. McDonagh JE, Nathan VV, Bonavia IC, Moyle GR, Tanner AR. Caffeine clearance by enzyme multiplied immunoassay technique: a simple, inexpensive, and useful indicator of liver function. *Gut.* 1991 Jun;32(6):681-4. doi: 10.1136/gut.32.6.681.
5. Tripathi A, Tiwari B, Patil R, Khanna V, Singh V. The role of salivary caffeine clearance in the diagnosis of chronic liver disease. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2015 Jan-Apr;5(1):28-33. doi: 10.1016/j.jobcr.2014.12.003.
6. Gajewska M, Paini A, Sala Benito JV, Burton J, Worth A, Urani C, Briesen H, Schramm KW. In vitro-to-in vivo correla-



tion of the skin penetration, liver clearance and hepatotoxicity of caffeine. Food Chem Toxicol. 2015 Jan;75:39-49. doi: 10.1016/j.fct.2014.10.017.

7. Berton M, Bettonte S, Stader F, Battagay M, Marzolini C. Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling to Identify Physiological and Drug Parameters Driving Pharmacokinetics in Obese Individuals. Clin Pharmacokinet. 2023 Feb;62(2):277-295. doi: 10.1007/s40262-022-01194-3.

8. Фармакокинетические параметры кофеина у лабораторных животных в контексте оценки функционального состояния печени / О. С. Попова, В. С. Пономарев, А. В. Кострова, Л. А. Агафонова // Международный вестник ветеринарии. – 2023. – № 2. – С. 142-149. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2023.2.142.

9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей редакцией Р.У. Хабриева – Издание 2-е, переработанное и дополненное. – Москва: Издательство "Медицина", 2005. – 832 с. – ISBN 5225042198

10. Биохимия печени и лабораторная оценка ее физиолого-биохимического состояния : учебно-методическое пособие / О. С. Белоновская, А. А. Лисицына, Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2014. – 116 с.

11. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Доступно по: [https://rm.coe.int/168007\\_aba8](https://rm.coe.int/168007_aba8). Ссылка активна на 27 июля 2023 г.

12. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Доступно по: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:007> 9:en:PDF.

Ссылка активна на 27 июля 2023 г

13. Понятие и значение критерия Стюдента в клинической медицине / М. А. Полиданов, И. С. Блохин, А. А. Скороход

[и др.] // Modern Science. – 2020. – № 2-1. – С. 227-230.

## REFERENCES

1. Study of the activity of cytochrome P450 isoenzymes for predicting drug-drug interactions in conditions of polypharmacy / D. A. Sychev, V. A. Otdelenov, N. P. Denisenko, V. V. Smirnov // Pharmacogenetics and pharmacogenomics. – 2016. – No. 2. – P. 4-11.

2. Nehlig A. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption. Pharmacol Rev. 2018 Apr;70(2):384-411. doi: 10.1124/pr.117.014407.

3. Culm-Merdek KE, von Moltke LL, Harmatz JS, Greenblatt DJ. Fluvoxamine impairs single-dose caffeine clearance without altering caffeine pharmacodynamics. Br J Clin Pharmacol. 2005 Nov;60(5):486-93. doi: 10.1111/j.1365-2125.2005.02467.x.

4. McDonagh JE, Nathan VV, Bonavia IC, Moyle GR, Tanner AR. Caffeine clearance by enzyme multiplied immunoassay technique: a simple, inexpensive, and useful indicator of liver function. Gut. 1991 Jun;32(6):681-4. doi: 10.1136/gut.32.6.681.

5. Tripathi A, Tiwari B, Patil R, Khanna V, Singh V. The role of salivary caffeine clearance in the diagnosis of chronic liver disease. J Oral Biol Craniofac Res. 2015 Jan-Apr;5(1):28-33. doi: 10.1016/j.jobcr.2014.12.003.

6. Gajewska M, Pains A, Sala Benito JV, Burton J, Worth A, Urani C, Briesen H, Schramm KW. In vitro-to-in vivo correlation of the skin penetration, liver clearance and hepatotoxicity of caffeine. Food Chem Toxicol. 2015 Jan;75:39-49. doi: 10.1016/j.fct.2014.10.017.

7. Berton M, Bettonte S, Stader F, Battagay M, Marzolini C. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Identify Physiological and Drug Parameters of Driving Pharmacokinetics in Obese Individuals. Clin Pharmacokinet. 2023 Feb;62(2):277-295. doi:10.1007/s40262-022-01194-3.

8. Pharmacokinetic parameters of caffeine in laboratory animals in the context of assessing the functional state of the liver / O.

- S. Popova, V. S. Ponamarev, A. V. Kostrova, L. A. Agafonova // International Bulletin of Veterinary Medicine. – 2023. – No. 2. – P. 142-149. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2023.2.142.
9. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Under the general editorship of R.U. Khabrieva – 2nd edition, revised and expanded. – Moscow: Publishing House "Medicine", 2005. – 832 pp. – ISBN 5225042198
10. Biochemistry of the liver and laboratory assessment of its physiological and biochemical state: educational manual / O. S. Belonovskaya, A. A. Lisitsyna, L. Yu. Karpenko, A. A. Bakhta. – St. Petersburg: St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, 2014. – 116 p.
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental or Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18 March 1986). Available from: [https://rm.coe.int/168007\\_a6a8](https://rm.coe.int/168007_a6a8). Link active as of July 27, 2023
12. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available from: [https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:007\\_9:en:PDF](https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:007_9:en:PDF). Link active as of July 27, 2023
13. The concept and significance of Student's criterion in clinical medicine / M. A. Polidanov, I. S. Blokhin, A. A. Skorokhod [etc.] // Modern Science. – 2020. – No. 2-1. – pp. 227-230.