

УДК: 616.36-07:619

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.154

ВЛИЯНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ГЕПАТОТОКСИКАНТОВ НА ЭЛИМИНАЦИЮ КОФЕИНА

Попова О.С.* – канд. ветеринар. наук, доц. каф. фармакологии и токсикологии (ORCID 0000-0002-0650-0837); **Понамарев В.С.** – канд. ветеринар. наук, ст. преп. каф. фармакологии и токсикологии (ORCID 0000-0002-6852-3110); **Кострова А.В.** – асп. каф. фармакологии и токсикологии; **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: 16.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Гепатотоксиканты представляют собой разнообразные химические вещества, способные оказывать органоспецифическое повреждающее действие, что может быть результатом их прямого воздействия как на гепатоциты, так и на другие структурные единицы печени. Цель настоящего исследования – оценка влияния современных гепатотоксикантов на элиминацию кофеина. Исследования проводились в виварии кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Для индуцирования гепатотоксичных состояний использовались промышленные вещества разных химических групп: фталевый ангидрид, этилендиамин и хлороформ. Все вышеперечисленные токсиканты задавались в дозировках для одномоментной (в течение суток) индукции гепатотоксичных состояний. Спустя сутки после завершения моделирования, у подопытных животных определялись уровни кофеина в сыворотке крови в полном соответствии с предыдущей серией опыта, с использованием дозировки 100мг/кг, так как при данном режиме дозирования нами были выявлены наиболее стабильные фармакокинетические профили кофеина. 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. На основании проведенных исследований мы можем сделать вывод, что каждый гепатотоксикант имеет индивидуальные характерные особенности, что позволяет рекомендовать кофеиновую пробу для разных видов гепатотоксичности, в т.ч. невыраженной. То есть таким способом можно диагностировать гепатотоксичные состояния даже в латентной форме, что может быть использовано, как метод оценки токсичности препарата на стадии доклинических разработок.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Гепатотоксиканты представляют собой разнообразные химические вещества, способные оказывать органоспецифическое повреждающее действие, что может быть результатом их прямого воздействия как на гепатоциты, так и на другие структурные единицы печени[1].

Одним из механизмов действия гепатотоксикантов является образование реактивных метаболитических интермедиатов в процессе биотрансформации в печени. Нарушение нормальной элиминации данных веществ может приводить к накоплению токсических метаболитов и развитию гепатотоксических эффектов[2].

Еще одним механизмом воздействия гепатотоксикантов является окислительный стресс, возникающий при усилении образования свободных радикалов и снижении активности антиоксидантной системы организма. Повышенное образование свободных радикалов в печени может вызывать повреждения клеточных структур, включая липидные мембраны, что, в свою очередь, негативно сказывается на функциональности данного органа[3].

В целом, механизмы действия гепатотоксикантов являются сложным и многогранным процессом, включающим взаимодействие различных факторов, метаболитических путей и иммунной системы. Изучение этих механизмов имеет важное значение для разработки способов предотвращения и лечения гепатопатий различного генеза, а также позволяет оценить потенциальную токсичность новых химических веществ[4].

Важной научной проблемой является диагностика токсического действия гепатотоксикантов, так как при их даже незначительном поступлении, токсичность может проявляться латентно, в то время как в научно-исследовательской литературе описаны кумулятивные эффекты подобных соединений [5]. Одним из способов такой диагностики может являться контроль за изменением клиренса специфических соединений, являющихся маркерами состояния в т.ч. детоксикационной функции печени. Таким маркером может

являться элиминация кофеина, которая является перспективным предиктором [6].

Цель настоящего исследования - оценка влияния современных гепатотоксикантов на элиминацию кофеина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования проводились в виварии кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ. Количество животных, их возрастные характеристики, живая масса, условия кормления и содержания были эквивалентны с предыдущей серией эксперимента [7].

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 [8,9]. Дизайн исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Для индуцирования гепатотоксических состояний использовались промышленные вещества разных химических групп:

- Ангидриды карбоновых кислот - фталевый ангидрид;
- Алифатические амиды- этилендиамин;
- Органические токсиканты – хлороформ.

Все вышеперечисленные токсиканты задавались в дозировках для одномоментной (в течение суток) индукции гепатотоксических состояний [10,11,12].

Спустя сутки после завершения моделирования, у подопытных животных определялись уровни кофеина в сыворотке крови в полном соответствии с предыдущей серией опыта [7], с использованием дозировки 100мг/кг, так как при данном режиме дозирования нами были выявлены наиболее стабильные фармакокинетические профили кофеина.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В ходе эксперимента не было выявлено патологических реакций со стороны сердечно-сосудистой системы в результате введения препарата. Уровень кофеина определяли в плазме крови на спектрофотометре УФ 1100, согласно методике [7] представлены в таблице 1.

После проведения анализа полученных данных, мы пришли к выводу, что не существует какой-либо связи между процессом биотрансформации кофеина у самцов и самок. Более того, мы обнаружили, что уровень кофеина в сыворотке крови подопытных животных значительно выше, чем у животных без какой-либо патологии. Одновременно, временной интервал полного удаления кофеина не охватывался в исследуемых временных рамках (рис.1).

Фармакокинетический профиль кофеина при использовании фталевого альде-

гида можно охарактеризовать следующим образом: длительно плато (до 4 часов), затем- планомерное снижение уровня, что характерно, учитывая количественный показатель уровня, незначительным негативным влиянием на функциональное состояние печени.

При использовании этилендиамина кофеиновый профиль также характеризовался длительно плато (до 4 часов), сменяющимся дальнейшим резким снижением, что характерно для умеренного негативного влияния на функциональное состояние печени. Применение хлороформа характеризовалось чередующимися снижениями и подъемами уровня кофеина в течение 8 часов, а затем- незначительным снижением, что характерно для выраженного гепатотоксичного действия.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что гепатотоксичность зависит от химической структуры потенциального гепатотоксиканта. И анализ безопасности и эффективности лекарственных препаратов помогает более точно оценивать потенциальный риск для печени при использовании различных химических веществ в ветеринарии.

Таблица 1 – Уровень кофеина в плазме крови (в мкг) после введение экзогенного кофеина у подопытных крыс после применения гепатотоксикантов разных групп(n=6)

Используемый гепатотоксикант	Фталевый ангидрид		Этилендиамин		Хлороформ	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Т после введения / пол животных						
30 мин	81,6±7,5	79,9±5,7	72,4±5,2	73,7±4,3	67,2±4,1	66,5±5,2
1 час	82,7±6,9	81,2±6,1	72,2±4,9	73,4±5,1	71,6±3,9	71,1±4,6
2 часа	81,4±7,1	80,6±5,7	69,3±4,7	70,5±4,8	79,3±3,7	81,3±4,2
4 часа	80,3±6,2	78,3±5,3	67,1±5,3	70,2±5,7	80,4±4,2	80,2±4,5
8 часов	71,4±5,8	71,5±6,4	42,8±4,1	45,2±6,2	79,5±3,8	81,1±5,7
12 часов	58,6±6,1	59,7±3,5	34,7±3,9	37,3±5,3	62,1±4,7	60,3±5,1

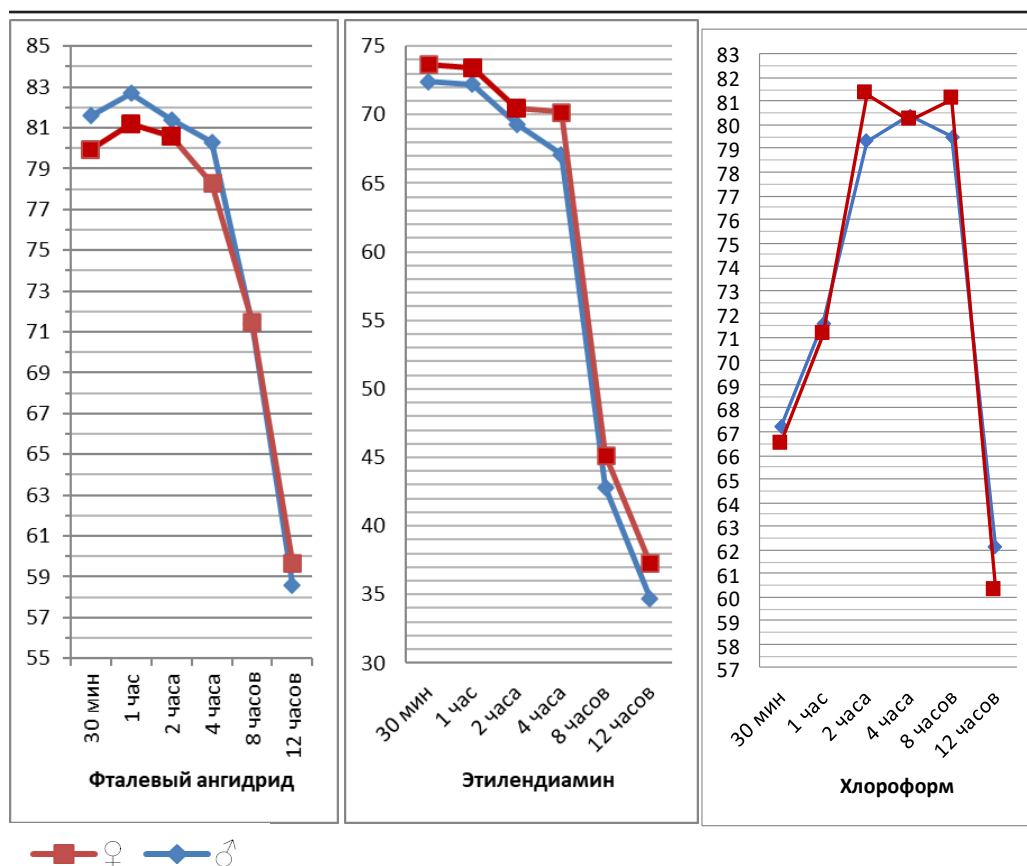


Рисунок 1 – Уровень кофеина в плазме крови (в мкг) у самцов (♂) и самок (♀) подопытных крыс после введения экзогенного кофеина у подопытных крыс после применения гепатотоксикантов разных групп (n=6)

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Важнейшими биохимическими изменениями в гепатоцитах при химическом поражении печени являются накопление нейтральных липидов, нарушение активности мембран эндоплазматического ретикулума с резким снижением антитоксической функции органа, биоэнергетических процессов в митохондриях, угнетение белкового синтеза, дисбаланс ионного состава клетки вследствие повреждения мембранных транспортных систем, изменения активности внутриклеточных мессенжеров.

На основании проведенных исследований мы можем сделать вывод, что каждый гепатотоксикант имеет индивидуаль-

ные характерные особенности, что позволяет рекомендовать кофеиновую пробу для разных видов гепатотоксичности, в т.ч. невыраженной. То есть таким способом можно диагностировать гепатотоксичные состояния даже в латентной форме, что может быть использовано, как метод оценки токсичности препарата на стадии доклинических разработок.

INFLUENCE OF MODERN HEPATOTOXICANTS ON CAFFEINE ELIMINATION

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) – Senior Lecturer, Ph.D. of Veterinary Science, **Kostrova A.V.** – graduate student, **Agafonova L.A.** – student.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*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

Hepatotoxicants are a variety of chemical substances that can have organ-specific damaging effects, which may be the result of their direct effects on both hepatocytes and other structural units of the liver. The purpose of this study is to evaluate the effect of modern hepatotoxicants on caffeine elimination. 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. Industrial substances of different chemical groups have been used to induce hepatotoxic conditions: phthalic anhydride, ethylenediamine and chloroform. All of the above toxicants were given in dosages for the immediate (within 24 hours) induction of hepatotoxic conditions. One day after the completion of the simulation, the levels of caffeine in the blood serum of the experimental animals were determined in full accordance with the previous series of experiments, using a dosage of 100 mg/kg, since with this dosage regimen we identified the most stable pharmacokinetic profiles of caffeine. Mathematical and statistical processing of the obtained data was carried out using the STATISTICA 6.1 program. The arithmetic mean (M) and its mean error (m) were calculated; the significance of the difference (p) was not calculated using the Student's test due to the exploratory nature of the study and the lack of comparison groups. Based on the conducted research, we can conclude that each hepatotoxicant has individual characteristic characteristics, which

allows us to recommend a caffeine test for different types of hepatotoxicity, incl. unexpressed. That is, in this way it is possible to diagnose hepatotoxic conditions even in a latent form, which can be used as a method for assessing the toxicity of a drug at the stage of preclinical development.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mechanism-Driven Read-Across of Chemical Hepatotoxicants Based on Chemical Structures and Biological Data / L. Zhao, D. P. Russo, W. Wang [et al.] // *Toxicological Sciences*. – 2020. – Vol. 174, No. 2. – P. 178-188. – DOI 10.1093/toxsci/kfaa005.
2. A systematic review on hepatoprotective activity of quercetin against various drugs and toxic agents: Evidence from preclinical studies / R. B. Pingili, S. R. Challa, A. K. Pawar [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2020. – Vol. 34, No. 1. – P. 5-32. – DOI 10.1002/ptr.6503.
3. Qinna, N. A. Chemical induction of hepatic apoptosis in rodents / N. A. Qinna, B. Y. Ghanim // *Journal of Applied Toxicology*. – 2019. – Vol. 39, No. 2. – P. 178-190. – DOI 10.1002/jat.3740.
4. Понамарев, В. С. Компендиум методологических подходов индуцирования гепатотоксичности у лабораторных животных / В. С. Понамарев, В. А. Барышев // *Journal of Agriculture and Environment*. – 2023. – № 1 (29). – DOI 10.23649/jae.2023.1.39.002.
5. Validation of precision-cut liver slices to study drug-induced cholestasis: a transcriptomics approach / S. Vatakuti, P. Olinga, J. L. A. Pennings, G. M. M. Groothuis // *Archives of Toxicology*. – 2017. – Vol. 91, No. 3. – P. 1401-1412. – DOI 10.1007/s00204-016-1778-8.
6. Validation of precision-cut liver slices to study drug-induced cholestasis: a transcriptomics approach / S. Vatakuti, P. Olinga, J. L. A. Pennings, G. M. M. Groothuis // *Archives of Toxicology*. – 2017. – Vol. 91, No. 3. – P. 1401-1412. – DOI 10.1007/s00204-016-1778-8.
7. Попова, О.С. Фармакокинетические параметры кофеина у лабораторных животных в контексте оценки функциональ-

ного состояния печени / О. С. Попова, В. С. Понамарев, А. В. Кострова, Л. А. Агафонова // Международный вестник ветеринарии. – 2023. – № 2. – С. 142-149. – DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.2.142.

8. 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_аба8. Ссылка активна на 27 октября 2023 г.

9. 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 октября 2023 г.

10. Паспорт безопасности №7905: трихлорметан / Хлороформ D1 with TMS (0,03 vol.%) 99,8 Atom%D: дата пересмотра 22.04.2022. В соответствии с ГОСТ 30333-2007. 17 с. Доступ: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-7905-RU-RU.pdfcontext=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNDk2MzN8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oMmMvaGEzLzkwNzAxMzEyMTY0MTQucGRmfDhhODczZTgwNGIyNmZkYTJkOGIwZjk4YmI2MmY2NjFiZWE2NWQxYjQxMDM5MzkwMWU5Y2JlODFmM2I0NDRIYWI> (дата посещения: 29.11.2023)

11. Паспорт безопасности №4218: Этилендиамин ≥99,5 %, для синтеза: дата пересмотра 04.01.2022. В соответствии с ГОСТ 30333-2007. 18 с. Доступ: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-4218-RU-RU.pdfcontext=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNDc0NTB8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oN2QvaDc1LzkwNTcwNzg3Mzg5NzQucGRmfGFjN2Q0YjQ0Y2IxNDcyNmU5ZWJiNmZjYmE2MTJkODI0MGi5NzMwN2MxNmVkNjRiNjkzMWE5M2I1MmU3M2YyMmY> (дата посещения: 29.11.2023)

12. Паспорт безопасности №3544: Фталевый ангидрид ≥98 %, для синтеза: дата пересмотра 01.08.2022. В соответствии с

ГОСТ 30333-2007. 16 с. Доступ: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-3544-RU-RU.pdfcontext=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMTQ5Njh8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOTcvaDdiLzkwODI5Njc5Mjg0NDYucGRmfGQxZDdiYTl4MTZiZDg0OWVmZjczODRhMjhjNzhjNzBhNGZmN2E3YzI3ODNhN2MxY2M1ZDI4Y2I0NjNmMTMzMmM> (дата посещения: 29.11.2023)

REFERENCES

1. Mechanism-Driven Read-Across of Chemical Hepatotoxicants Based on Chemical Structures and Biological Data / L. Zhao, D. P. Russo, W. Wang [et al.] // Toxicological Sciences. – 2020. – Vol. 174, No. 2. – P. 178-188. – DOI 10.1093/toxsci/kfaa005.
2. A systematic review on hepatoprotective activity of quercetin against various drugs and toxic agents: Evidence from preclinical studies / R. B. Pingili, S. R. Challa, A. K. Pawar [et al.] // Phytotherapy Research. – 2020. – Vol. 34, No. 1. – P. 5-32. – DOI 10.1002/ptr.6503.
3. Qinna, N. A. Chemical induction of hepatic apoptosis in rodents / N. A. Qinna, B. Y. Ghanim // Journal of Applied Toxicology. – 2019. – Vol. 39, No. 2. – P. 178-190. – DOI 10.1002/jat.3740.
4. Ponamarev, V. S. Compendium of methodological approaches to inducing hepatotoxicity in laboratory animals / V. S. Ponamarev, V. A. Baryshev // Journal of Agriculture and Environment. – 2023. – No. 1(29). – DOI 10.23649/jae.2023.1.39.002.
5. Validation of precision-cut liver slices to study drug-induced cholestasis: a transcriptomics approach / S. Vatakuti, P. Olinga, J. L. A. Pennings, G. M. M. Groothuis // Archives of Toxicology. – 2017. – Vol. 91, No. 3. – P. 1401-1412. – DOI 10.1007/s00204-016-1778-8.
6. Validation of precision-cut liver slices to study drug-induced cholestasis: a transcriptomics approach / S. Vatakuti, P. Olinga, J. L. A. Pennings, G. M. M. Groothuis // Archives of Toxicology. – 2017. – Vol. 91, No. 3. – P. 1401-1412. – DOI 10.1007/s00204-016-1778-8.

7. Popova, O.S. 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 Veterinary Bulletin. – 2023. – No. 2. – P. 142-149. – DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.2.142.
8. 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. Link active as of October 27, 2023
9. 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.douri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>. Link active as of October 27, 2023
10. Safety data sheet No. 7905: trichloromethane / Chloroform D1 with TMS (0.03 vol.%) 99.8 Atom%D: revision date 04/22/2022. In accordance with GOST 30333-2007. 17 p. Access: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-7905-RU-RU.pdfcontext=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNDk2MzN8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oMmMvaGEzLzkwNzAxMzEyMTY0MTQucGRm-fDhhODczZTgwNGIyNmZkYTJkOGIwZjk4YmI2MmY2NjFiZWE2NWQxYjQxMDM5MzkwMWU5Y2JlODFmM2I0NDRIYWl> (date of visit: 11/29/2023)
11. Safety Data Sheet No. 4218: Ethylenediamine $\geq 99.5\%$, for synthesis: revision date 01/04/2022. In accordance with GOST 30333-2007. 18 p. Access: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-4218-RU-RU.pdfcontext=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNDc0NTB8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oN2QvaDclLzkwNTcwNzg3Mzg5NzQucGRm-fGFjN2Q0YjQ0Y2IxNDcyNmU5ZWJiNmZjYmE2MTJkODI0MGI5NzMwN2MxNmVkNjRiNjkzMWE5M2I1MmU3M2YyMmY> (date of visit: 11/29/2023)
12. Safety data sheet No. 3544: Phthalic anhydride $\geq 98\%$, for synthesis: revision date 08/01/2022. In accordance with GOST 30333-2007. 16 p. Access: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-3544-RU-RU.pdfcontext=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMTQ5Njh8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOTcvaDdiLzkwODI5NjcyMjc0NDYucGRm-fGQxZDdiYTl4MTZiZDg0OWVmZjczODRhMjhjNzhjNzBhNGZmN2E3YzI3ODNhN2MxY2M1ZDI4Y2I0NjNmMTMzMmM> (date of visit: 11/29/2023)