

УДК: 616.36-07:619

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.2.142

## ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОФЕИНА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В КОНТЕКСТЕ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ

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

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: 11.04.2023

Принята к публикации: 10.05.2023

Опубликована онлайн: 29.06.2023



### РЕФЕРАТ

На сегодняшний день оценка функционального состояния гепатобилиарной системы посредством анализа изменений клиренса экзогенного кофеина является одним из перспективнейших печёночных нагрузочных проб. Цель исследования - установить фармакокинетическое изменение уровней экзогенного кофеина в плазме крови лабораторных животных с целью дальнейшего индуцирования различных патологий печени и последующей оценки изменения его клиренса. Для исследования были использованы нелинейные лабораторные крысы (18 самцов, 18 самок, средняя живая масса 180 г.  $\pm 4\%$ , возраст - 3 месяца). Из подопытных животных было сформировано 3 группы (по 6 самок и 6 самцов в каждой), каждой из которых подкожно вводился 20% раствор кофеин-натрия бензоат (ООО «Мосагроген», Россия) с шагом в 50 мг/кг (50, 100, 150) в пересчёте на чистый кофеин.

При использовании дозировок в 100 и 150 мг/кг нами отмечалась нелинейная биотрансформация исследуемого вещества, а именно, пиковые значения концентрации спустя 4 часа после введения, что также является стандартным фармакокинетическим показателем для дозировок, проходящих по верхней границе терапевтической широты препарата и связано с тем, что при подобных дозировках ферментная система цитохрома P-450 не отличается реактивностью по сравнению со временем всасывания вещества.

В результате эксперимента, нами были установлены начальные и пиковые уровни кофеина для дальнейшего изучения его изменений при искусственном индуцировании гепатопатий различного генеза в конкретной экспериментальной группе лабораторных животных. Также нами было отмечено отсутствие зависимости от пола перечисленных уровней, причём такие результаты согласуются с полученными данными других исследователей.

## ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

На сегодняшний день оценка функционального состояния гепатобилиарной системы посредством анализа изменений клиренса экзогенного кофеина является одним из перспективнейших печёночных нагрузочных проб, что обусловлено его исключительным (97-98%) метаболизмом с задействованием ферментной системой цитохрома Р-450 с образованием таких продуктов биотрансформации, как теобромин и теофиллин, которые, с точки зрения своих химических свойств, не определяются специфическими количественными и качественными кофеиновыми реакциями, что позволяет с высокой точностью дифференцировать уровни кофеина в биологических жидкостях и оценивать динамику его биотрансформации, которая существенно видоизменяется при наличии функциональных нарушений. Кофеин относительно быстро и в полном объёме достигает система кровотока независимо от способа введения, имеет низкое связывание с плазмой, а также короткий период полувыведения, отличную переносимость (при условии контроля его влияния на сердечно-сосудистую систему), и его биотрансформация практически ограничивается печенью [1,2,3,4,5,6].

Несмотря на большой потенциал кофеина в качестве ординарного вещества для тестирования функции печени [7], его использование до сих пор не нашло широкого клинического применения. Основной проблемой в использовании данного метода является широкая видовая и индивидуальная вариабельность основных фармакокинетических параметров, что не позволяет однозначно подобрать методику измерения уровней кофеина.

Таким образом, наиболее оптимальным способом оценки клиренса является его индивидуальное изучение у животных, здоровых с точки зрения клинико-биохимических параметров, с дальнейшим индуцированием гепатопатологий различного генеза на тех же животных. Подобные дизайны эксперимента объясняются тем, что, несмотря на то, что фармакокинетика кофеина изучалась во мно-

жестве клинических испытаний, каждое из которых имело свою направленность, полученные другими исследователями данные невозможно использовать в связи с изменчивостью данного показателя индивидуально у каждого животного.

Цель исследования - установить фармакокинетическое изменение уровней экзогенного кофеина в плазме крови лабораторных животных с целью дальнейшего индуцирования различных патологий печени и последующей оценки изменения его клиренса.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ / MATERIALS AND METHOD

Исследования проводились в виварии кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ. 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 исследования были использованы нелинейные лабораторные крысы (18 самцов, 18 самок, средняя живая масса 180 г.  $\pm 4\%$ , возраст- 3 месяца) [10], закупленные в Федеральном государственном унитарном предприятии «Питомник лабораторных животных «Рапполово».

Перед исследованием все животные были подвергнуты профилактическому карантинированию (акклиматизационный период). В течение карантинирования проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность) [11].

В комнате содержания животных поддерживались следующие условия окружа-

ющей среды: температура окружающего воздуха 18-24°C; относительная влажность 50-60%; автоматическая смена 12-ти часового светового периода (06.00-18.00 – день, 18.00-06.00 –ночь); 100% вентиляция без рециркуляции со сменной воздушной 7-12 объемов комнаты в час [12].

Крысы содержались в поликарбонатных клетках на подстилке площадью 2150 см<sup>2</sup>. В качестве подстилки использовались опилки деревьев хвойных пород, стерилизованные в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовался комбикорм полнорационный для лабораторных животных ЛБК-120 (Тосненский комбикормовый завод), соответствующий ГОСТ 34566-2019. Профильтрованная водопроводная вода давалась в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках [12].

Из подопытных животных было сформировано 3 группы (по 6 самок и 6 самцов в каждой), каждой из которых подкожно вводился 20% раствор кофеин-натрия бензоат (ООО «Мосагроген», Россия) с шагом в 50 мг/кг (50, 100, 150) в пересчете на чистый кофеин. Данные дозировки обосновываются тем, что, по мнению большинства исследователей, именно такой шаг, попадающий в терапевтическую широту действия препарата, даёт наиболее прогнозируемые и определяемые концентрации кофеина в плазме крови.

По истечении 10 минут после введения у каждого животного регистрировались показатели электрокардиограммы с помощью беспроводной системы регистрации и анализа ЭКГ животных «Физиобелт» (ООО «Нейробиотикс», Россия) с целью исключения животных из эксперимента при наличии негативных реакций на вводимый препарат со стороны сердечно-сосудистой системы.

Спустя 30 мин., 1, 2, 4, 8 и 12 часов у подопытных животных отбирали кровь путём венепункции хвостовой вены [13,14] с сохранением ее интактного состояния и получения плазмы, в которой с помощью модернизированной методики

определения кофеина в биологических жидкостях Стреловой О.Ю. и Чувиной Н.А. (2008 г.) [15] регистрировался уровень кофеина. Для реализации вышеуказанной методики использовали спектрофотометр модели УФ-1100 («Shanghai Mapada Instruments Co.,Ltd», Китай). Общее количество отобранного за 6 венепункций биоматериала не превышало 1% от общего объема крови [16]. Временные интервалы выбирались исходя из зарегистрированного периода полувыведения препарата.

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 результате эксперимента негативных 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.

При использовании дозировки в 50 мг/кг наблюдалось стандартное линейное снижение уровня кофеина в плазме крови с резким снижением на 4 час после снижения, что, в целом, отражает стандартную для данного вещества фармакокинетику. Тот факт, что по истечении 12 часов кофеин не определялся, свидетельствует о его естественной метаболизации и отсутствии функциональных способностей печени.

При использовании дозировок в 100 и 150 мг/кг нами отмечалась нелинейная биотрансформация исследуемого вещества, а именно, пиковые значения концентрации спустя 4 часа после введения, что также является стандартным фармакокинетическим показателем для дозировок, проходящих по верхней границе терапевтической широты препарата и связано с тем, что при подобных дозировках фер-

ментная система цитохрома Р-450 не отличается реактивностью по сравнению со временем всасывания вещества.

По сравнению с начальными и пиковыми уровнями, количество кофеина в

сыворотке спустя 12 часов после введения можно считать «следовым», что также может свидетельствовать об отсутствии метаболических изменений (рис.1).

**Таблица 1**  
**Уровень кофеина в плазме крови (в мкг) после введения экзогенного кофеина**

Вводимая дозировка препарата (в пересчете на чистый кофеин)	50 мг/кг		100 мг/кг		150 мг/кг	
Т после введения / пол животных	♂	♀	♂	♀	♂	♀
30 мин	18,1±0,3	19,4±1,2	53,0±5,2	51,2±5,8	94,3±9,7	92,8±9,4
1 час	16,5±0,2	16,9±0,9	48,3±3,1	49,7±3,3	89,1±7,3	90,3±7,1
2 часа	13,2±0,3	13,3±0,4	51,1±2,5	50,8±3,4	92,5±4,3	91,4±4,7
4 часа	8,4±0,1	7,8±0,3	62,7±2,3	63,1±3,1	97,4±5,4	95,3±5,2
8 часов	4,1±0,2	3,5±0,1	52,2±2,6	51,4±2,2	81,2±5,2	84,7±5,6
12 часов	-	-	4,6±0,1	5,0±0,2	35,6±3,5	39,1±3,3

Анализируя полученные данные, нами было отмечено отсутствие корреляции между характером биотрансформации кофеина у самцов и самок. Это согласуется с авторами других источников [2,3], что даст нам основание не использовать для дальнейших расчетов данный показатель. В связи с особенностью фармакокинетики кофеина нами фиксировалась его максимальная концентрация при введении дозировок нижней границы терапевтической широты (50 мг/кг) спустя 30 минут после введения с характерным линейным снижением, в то время как при введении максимально допустимых дозировок (верхняя граница терапевтической широты, 100 и 150 мг/кг) максимальная концентрация наблюдалась спустя 4 часа после введения, что связано с задержкой индукции звеньев ферментной системы цитохрома Р-450 для дальнейшей биотрансформации кофеина, после чего

наблюдалось линейное уменьшение его уровня.

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате эксперимента, нами были установлены начальные и пиковые уровни кофеина для дальнейшего изучения его изменений при искусственном индуцировании гепатопатий различного генеза в конкретной экспериментальной группе лабораторных животных. Полученные данные позволят изучить изменения уровня кофеина у данной группы животных, только уже при экспериментальных гепатотоксичных состояниях.

Так как нами отмечена нелинейность выведения кофеина при дозировках 100 мг/кг и 150 мг/кг, необходимо при последующей постановке эксперимента, использовать все 3 дозировки (минимальную, оптимальную и максимальную терапевтическую), а диагности-

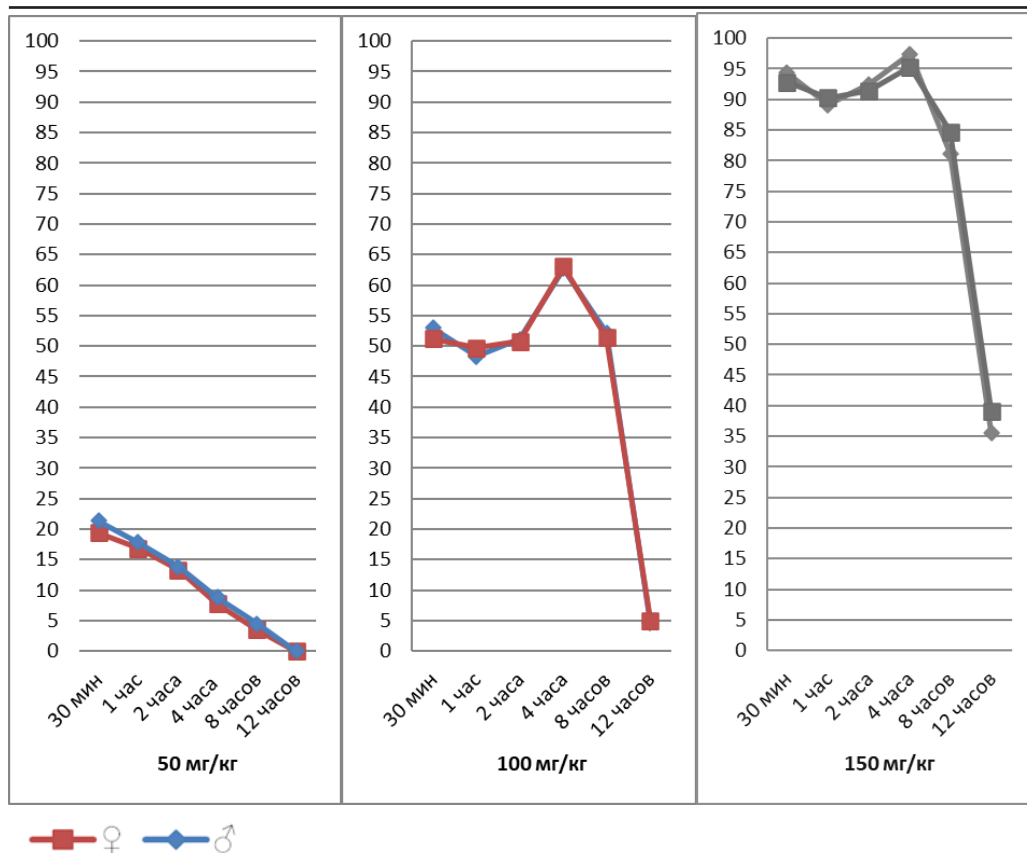


Рисунок 1 – Уровень кофеина в плазме крови (в мкг) у самцов (♂) и самок (♀), после подкожного введения 20% раствора кофеин-натрия бензоата в дозе 50,100 и 150 мг/кг

ческим критерием будет является изменение динамики биотрансформации кофеина.

В продолжении исследований планируется создание так называемых «кофеиновых» кривых (графиков, отражающих динамику элиминации экзогенного кофеина в зависимости от времени и дозировки), которые позволят выявить наиболее релевантную нагрузочную дозировку, позволяющую по вектору графика элиминации делать выводы о функциональном состоянии печени, что в перспективе позволит углубить знание о прогностических функциях изменений клиренса различных фармацевтических субстанций.

#### PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF CAFFEINE IN LABORATORY ANIMALS IN THE CONTEXT OF ASSESSMENT OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER

**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.** - student FVM «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

To date, the assessment of the functional state of the hepatobiliary system by analyzing changes in the clearance of exogenous caffeine is one of the most promising hepatic stress tests. The purpose of the study was to establish the pharmacokinetic change in the levels of exogenous caffeine in the blood plasma of laboratory animals in order to further induce various liver pathologies and subsequently assess the change in its clearance.

For the study, non-linear laboratory rats were used (18 males, 18 females, average live weight  $180 \pm 4\%$ , age 3 months),

Of the experimental animals, 3 groups were formed (6 females and 6 males each), each of which was injected subcutaneously with a 20% solution of caffeine sodium benzoate (Mosagrogen LLC, Russia) in increments of 50 mg/kg (50, 100, 150) in terms of pure caffeine.

When using dosages of 100 and 150 mg/kg, we noted a non-linear biotransformation of the test substance, namely, peak concentrations 4 hours after administration, which is also a standard pharmacokinetic indicator for dosages passing along the upper limit of the therapeutic latitude of the drug and is due to the fact that at such dosages, the cytochrome P-450 enzyme system does not differ in reactivity compared to the absorption time of the substance.

As a result of the experiment, we established the initial and peak levels of caffeine for further study of its changes during the artificial induction of hepatopathy of various origins in a specific experimental group of laboratory animals. We also noted the absence of dependence on the sex of the listed levels, and such results are consistent with the data obtained by other researchers.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Weiser, T. Effect of Caffeine on the Bioavailability and Pharmacokinetics of an Acetylsalicylic Acid-Paracetamol Combination: Results of a Phase I Study / T. Weiser, H. Weigmann // *Advances in Therapy*. – 2019. – Vol. 36, No. 3. – P. 597-607. – DOI 10.1007/s12325-019-0891-5.

2. Willson, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study / C. Willson // *Toxicology Reports*. – 2018. – Vol. 5. – P. 1140-1152. – DOI 10.1016/j.toxrep.2018.11.002.

3. Nehlig, A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption / A. Nehlig // *Pharmacological Reviews*. – 2018. – Vol. 70, No. 2. – P. 384-411. – DOI 10.1124/pr.117.014407.

4. Fu, Li, G. Impact of Ethnicity-Specific Hepatic Microsomal Scaling Factor, Liver Weight, and Cytochrome P450 (CYP) 1A2 Content on Physiologically Based Prediction of CYP1A2-Mediated Pharmacokinetics in Young and Elderly Chinese Adults / G. Fu, Li, Q. Sh. Zheng, Y. Yu [et al.] // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2019. – Vol. 58, No. 7. – P. 927-941. – DOI 10.1007/s40262-019-00737-5.

5. Youssef, R. B. Bioanalytical Study of the Effect of Lycopene on the Pharmacokinetics of Theophylline in Rats / R. B. Youssef, M. A. Fouad, A. A. El-Zaher // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2020. – Vol. 53, No. 11. – P. 1053-1058. – DOI 10.1007/s11094-020-02121-1.

6. Sodhi, Ja. K. Volume of Distribution is Unaffected by Metabolic Drug-Drug Interactions / Ja. K. Sodhi, C. H. Huang, L. Z. Benet // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2021. – Vol. 60, No. 2. – P. 205-222. – DOI 10.1007/s40262-020-00926-7.

7. Da Silva, L. A. Mechanisms and biological effects of Caffeine on substrate metabolism homeostasis: A systematic review / L. A. Da Silva, R. Osiecki, J. Wouk [et al.] // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2017. – Vol. 7, No. 6. – P. 215-221. – DOI 10.7324/JAPS.2017.70632.

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\\_aba8](https://rm.coe.int/168007_aba8). Ссылка активна на 14 апреля 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/Lex>



UriServ/LexUriServ.do?

uri=OJ:L:2010:276:0033:007 9:en:PDF.

Ссылка активна на 14 апреля 2023 г.

10. 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.

11. Медведев, А. П. Основы анатомии, физиологии, содержания и использования лабораторных животных / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий. – Витебск : Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2016. – 204 с. – ISBN 978-985-512-930-2.

12. Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений РД-АПК 3.10.07.02-09 (утв. Министерством сельского хозяйства РФ 1 декабря 2009 г.)

13. Васильева С.В., Карпенко Л.Ю., Душенина О.А. Поиск оптимальных способов забора крови у лабораторных крыс в условиях хронического опыта. Генетика и разведение животных. 2022;(4):56-60. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2022-4-56-60>

14. Душенина, О. А. Анализ методов взятия крови у экспериментальных крыс / О. А. Душенина, Л. Ю. Карпенко, С. В. Васильева // Ветеринария Кубани. – 2022. – № 6. – С. 21-24. – DOI 10.33861/2071-8020-2022-6-21-24.

15. Стрелова О.Ю., Чувина Н.А. Изолирование кофеина из крови с применением ферментативного гидролиза на примере модельного вещества // Судебно-медицинская экспертиза. – 2008. – Т. 51, №4. – С. 28-31

16. Основы проведения биомедицинских исследований на лабораторных животных: учеб. пособие / М.О. Гомзикова, А.Г. Маланьева, З.Ю. Сираева – Казань: ИД «МедДок», 2021. –124 с.

## REFERENCES

1. Weiser, T. Effect of Caffeine on the Bioavailability and Pharmacokinetics of an Acetylsalicylic Acid-Paracetamol Combination: Results of a Phase I Study / T. Weiser, H. Weigmann // *Advances in Therapy*. - 2019. - Vol. 36, no. 3. - P. 597-607. – DOI 10.1007/s12325-019-0891-5.
2. Willson, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study / C. Willson // *Toxicology Reports*. - 2018. - Vol. 5. - P. 1140-1152. – DOI 10.1016/j.toxrep.2018.11.002.
3. Nehlig, A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption / A. Nehlig // *Pharmacological Reviews*. - 2018. - Vol. 70, no. 2. - P. 384-411. – DOI 10.1124/pr.117.014407.
4. Fu, Li, G. Impact of Ethnicity-Specific Hepatic Microsomal Scaling Factor, Liver Weight, and Cytochrome P450 (CYP) 1A2 Content on Physiologically Based Prediction of CYP1A2-Mediated Pharmacokinetics in Young and Elderly Chinese Adults / G. Fu, Li, Q. Sh. Zheng, Y. Yu [et al.] // *Clinical Pharmacokinetics*. - 2019. - Vol. 58, no. 7. - P. 927-941. – DOI 10.1007/s40262-019-00737-5.
5. Youssef, R. B. Bioanalytical Study of the Effect of Lycopene on the Pharmacokinetics of Theophylline in Rats / R. B. Youssef, M. A. Fouad, A. A. El-Zaher // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. - 2020. - Vol. 53, no. 11. - P. 1053-1058. – DOI 10.1007/s11094-020-02121-1.
6. Sodhi, Ja. K. Volume of Distribution is Unaffected by Metabolic Drug-Drug Interactions / Ja. K. Sodhi, C. H. Huang, L. Z. Benet // *Clinical Pharmacokinetics*. - 2021. - Vol. 60, no. 2. - P. 205-222. – DOI 10.1007/s40262-020-00926-7.
7. Da Silva, L. A. Mechanisms and biological effects of Caffeine on substrate metabolism homeostasis: A systematic review / L. A. Da Silva, R. Osiecki, J. Wouk [et al.] // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. - 2017. - Vol. 7, no. 6. - P. 215-221. – DOI 10.7324/JAPS.2017.70632.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental or other Scientific Purposes (Strasbourg, March

- 18, 1986). Available at: <https://rm.coe.int/168007a6a8>. Link active as of April 14, 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 at: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>. Link active as of April 14, 2023.
10. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Under the general editorship of R.U. Khabrieva - Edition 2, revised and supplemented. - Moscow: Publishing house "Medicine", 2005. - 832 p. - ISBN 5225042198.
11. Medvedev, A. P. Fundamentals of anatomy, physiology, maintenance and use of laboratory animals / A. P. Medvedev, A. A. Verbitsky. - Vitebsk: Educational Institution "Vitebsk Order of the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine ", 2016. - 204 p. - ISBN 978-985-512-930-2.
12. Guidelines for keeping laboratory animals in vivariums of research institutes and educational institutions RD-APK 3.10.07.02-09 (approved by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation on December 1, 2009)
13. Vasilyeva S.V., Karpenko L.Yu., Dushenina O.A. Search for optimal methods of blood sampling from laboratory rats under conditions of chronic experiment. Genetics and animal breeding. 2022;(4):56-60. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2022-4-56-60>
14. Dushenina, O. A. Analysis of blood sampling methods in experimental rats / O. A. Dushenina, L. Yu. Karpenko, S. V. Vasilyeva // Veterinary of Kuban. - 2022. - No. 6. - S. 21-24. - DOI 10.33861/2071-8020-2022-6-21-24.
15. Strelova O.Yu., Chuvina N.A. Isolation of caffeine from the blood using enzymatic hydrolysis on the example of a model substance // Forensic medical examination. - 2008. - V. 51, No. 4. - pp. 28-31
16. Fundamentals of biomedical research on laboratory animals: textbook. allowance / M.O. Gomzikova, A.G. Malanyeva, Z.Yu. Siraeva - Kazan: Publishing House "MedDoc", 2021. -124 p.