

MEHANIZAM KRONOTROPNOG DJELOVANJA KOFEINA I TEOFILINA U ZAMORČADI

D. ATANACKOVIĆ, A. SIMONIĆ I A. FRKOVIĆ

Farmakološki institut Medicinskog fakulteta, Rijeka

(Primljeno 22. X 1979)

Ispitivano je djelovanje kofeina i teofilina na frekvenciju rada izoliranog desnog atrija zamorčadi. Nađeno je da kofein a mnogostruko jače teofilin uzrokuju pozitivno kronotropno djelovanje. Reserpin i alfa-metil DOPA smanjuju pozitivno kronotropnu aktivnost ispitivanih metilksantina. Propranolol uzrokuje bradikardiju, koju naknadno dani metilksantini još više pojačavaju.

Kofein i teofilin u sisavaca ubrzavaju frekvenciju srčane akcije. To se djelovanje objašnjava na razne načine.

Razmotrit ćemo sljedeće mogućnosti njihova kronotropnog djelovanja:

- a) indirektno simpatomimetska aktivnost (1, 2, 3, 4, 5, 6),
- b) direktna stimulacija kontraktilnih elemenata miokarda (1, 6, 7, 8), pri čemu je još dvojbena značenje inhibicije c-3,5 AMP-a fosfodiesteraze miokarda (2, 8, 9), te utjecaj na razmjenu Ca^{++} u miokardu (2, 10, 11, 12, 13, 14).

U ovom smo radu ispitivali djelovanje spomenutih metilksantina u zamorčadi. Koristeći se svojim rezultatima (dobivenim pod istim eksperimentalnim uvjetima) (1, 6) o utjecaju kofeina i teofilina na frekvenciju otkucaja izoliranih atrija štakora, usporedili smo kronotropnu aktivnost spomenutih metilksantina u štakora i zamorčadi.

MATERIJAL I METODE

Eksperiment je rađen na 120 izoliranih desnih atrija muške zamorčadi težine 300—400 g.

Životinje su žrtvovane udarcem u zatiljak. Brzim kirurškim zahvatom izvađeno je srce. Odvojen je desni atrij koji je zatim nataknut na pla-

tinske elektrode uronjene u Krebs-Henseleitovu otopinu sljedećeg sastava NaCl 6,89 g · l⁻¹, KCl 0,35 g · l⁻¹, CaCl₂ 0,28 g · l⁻¹, MgSO₄ 0,143 g · l⁻¹, NaHCO₃ 2,1 g · l⁻¹, te glukoza 2,0 g · l⁻¹. Otopina se svaki dan pripremala svježa; bila je zagrijavana na 37 ± 0,25° C te obilno oksigenirana.

Nakon uspostavljanja stabilnog stanja u kupelj smo kumulativnom metodom unosili ispitivane supstancije. Svaka ispitivana koncentracija bila je 3,3 puta veća od prethodne. Aktivnost svake koncentracije je mjerena tokom 2 minute od unošenja pojedinačnih doza.

Akcija atrijske je praćena preko osciloskopa. Registrirana je apsolutna vrijednost promjena frekvencije nastale nakon davanja ispitivanja supstancija u odnosu na početnu frekvenciju rada atrijske.

Ispitivali smo djelovanje kofeina (natrijev benzoat) i teofilina (natrijev salicilat):

- a) u kontrolnim uvjetima,
- b) u prisutnosti 10⁻⁷ g · ml⁻¹ i 10⁻⁶ g · ml⁻¹ propranolola (hidroklorid),
- c) nakon što su životinje 4 dana, jednom na dan, dobivale 5 · 10⁻⁴ g · kg⁻¹ i. p. reserpina,
- d) nakon što su životinje 10 dana, jednom na dan, dobivale 10⁻³ g · kg⁻¹ i. p. alfa-metil DOPA.

Ispitivane koncentracije kofeina i teofilina bile su od 10⁻⁸ g · ml⁻¹ do 3 · 10⁻⁴ g · ml⁻¹. Teofilin je otapan u vodi uz lagano zagrijavanje.

Rezultati su obrađeni Studentovim »T«-testom (P ≤ 0,05).

REZULTATI

U kontrolnim uvjetima spontana frekvencija rada atrijske zamorčadi bila je 184 ± 11 otkucaja u minuti.

b) Metilksantini — kontrola

Ispitivanjem kronotropnog djelovanja kofeina i teofilina u kontrolnim uvjetima dobiveni su rezultati koje prikazuje sl. 1.

Kofein u malenim koncentracijama (do 10⁻⁷ g · ml⁻¹) kao i u koncentracijama iznad 10⁻⁵ g · ml⁻¹ ne mijenja frekvenciju kucanja atrijske. U koncentracijama unutar spomenutih granica kofein izaziva neznatno povećanje učestalosti kucanja atrijske (maksimum je 6 ± 4 udara/min).

Teofilin uzrokuje dvofazno djelovanje: u malenim koncentracijama (do 3 · 10⁻⁶ g · ml⁻¹) uzrokuje slabo izraženo negativno kronotropno djelovanje, a u većim koncentracijama pozitivno kronotropno djelovanje: povećava frekvenciju rada atrijske maksimalno za 33 ± 6 udara/min.

Maksimum pozitivne kronotropne aktivnosti teofilina je statistički značajno viši od maksimuma pozitivne kronotropne aktivnosti kofeina (P ≤ 0,05).

b) *Metilksantini — reserpin*

Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje ispitivanih metilksantina na izoliranim atrijima reserpinizirane zamorčadi pomaknute su udesno u odnosu na krivulje kontrolnih skupina (sl. 2. i sl. 3).

Na izoliranim atrijima reserpinizirane zamorčadi kofein i teofilin u nižim koncentracijama (do $3 \cdot 10^{-5}$ g · ml⁻¹) pokreću minimalno negativno kronotropno djelovanje. Teofilin maksimalno usporava kucanje atrija za 5 ± 5 , a kofein za 6 ± 4 udara u minuti. U većim koncentracijama obje supstancije izazivaju tahikardiju. Kofein u reserpiniziranih životinja maksimalno povećava frekvenciju rada atrija za 10 ± 6 udara · min⁻¹, teofilin za 32 ± 5 udara · min⁻¹. Ne postoji statistički značajna razlika u maksimumu pozitivnog kronotropnog djelovanja ispitivanih metilksantina u reserpiniziranih i kontrolnih životinja.

c) *Metilksantini — alfa metil DOPA*

Na izoliranim atrijima zamorčadi koja je dobivala alfa metil DOPA kofein izaziva statistički značajnu bradikardiju (maksimalno usporenje frekvencije rada atrija je 9 ± 2 udara u minuti) (sl. 4).

Krivulja omjera doza : odgovor kronotropnog djelovanja teofilina je u zamorčadi koja je dobivala alfa-metil DOPA pomaknuta udesno u odnosu na kontrolnu skupinu (sl. 5).

Teofilin izaziva dvofazno kronotropno djelovanje. U manjim koncentracijama (do 10^{-6} g · ml⁻¹) teofilin pokreće negativno (maksimalno usporenje je 2 ± 2 udara u minuti) a u većim koncentracijama pozitivno kronotropno djelovanje (maksimalno ubrzanje je 23 ± 4 udara u minuti) (sl. 5). Ne postoji statistički značajna razlika u maksimumu pozitivnog kronotropnog djelovanja teofilina u životinja koje su dobivale alfa-metil DOPA i kontrolnih životinja.

d) *Propranolol*

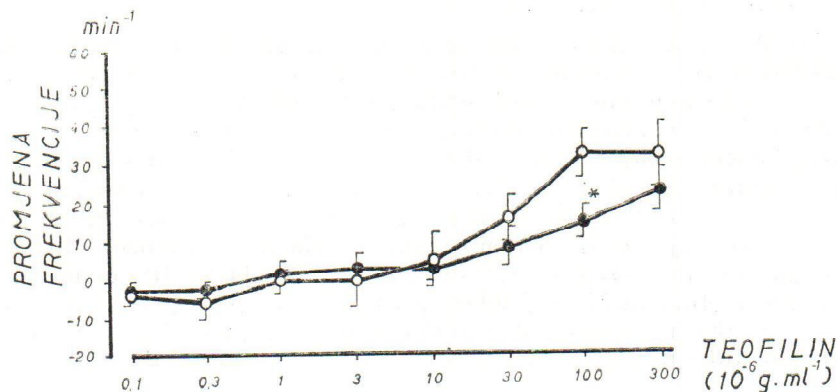
Propranolol uzrokuje u toku vremena sve jaču bradikardiju koja je jače izražena u prisutnosti veće koncentracije propranolola (sl. 6).

U prisutnosti 10^{-7} g · ml⁻¹ propranolola maksimalni pad frekvencije rada atrija je 10 ± 6 otkucaja u minuti. U prisutnosti 10^{-6} g · ml⁻¹ propranolola iznosi 37 ± 7 otkucaja u minuti, što je statistički značajno veći pad frekvencije ($P \leq 0,05$).

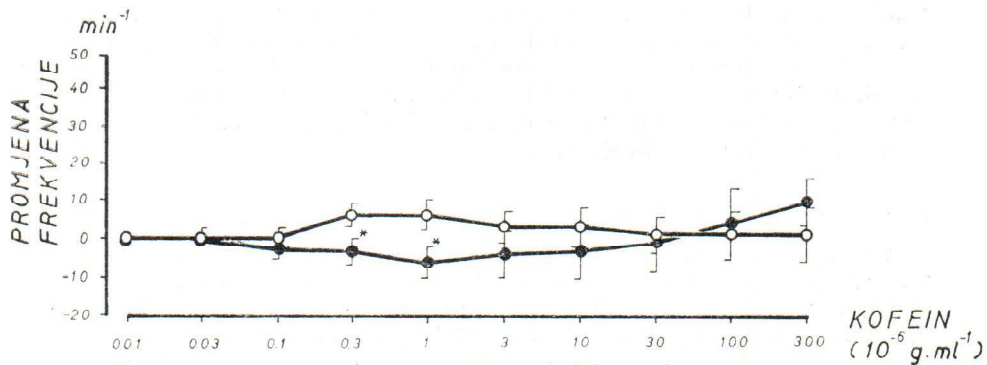
e) *Metilksantini — propranolol*

U prisutnosti 10^{-7} g · ml⁻¹ propranolola kronotropna aktivnost ispitivanih metilksantina je kao i u kontrolne skupine (sl. 7. i sl. 8).

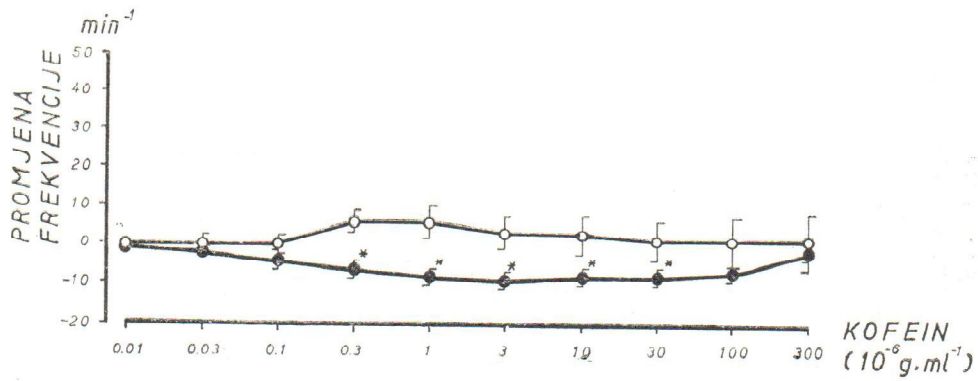
Međutim u prisutnosti 10^{-6} g · ml⁻¹ propranolola kofein i teofilin izazivaju, ovisno o ispitivanoj koncentraciji, sve veću bradikardiju (sl. 7. i sl. 8). Maksimalno smanjenje frekvencije rada atrija je 117 ± 29 otkucaja u minuti u prisutnosti kofeina te 109 ± 20 otkucaja u prisutnosti teofilina.



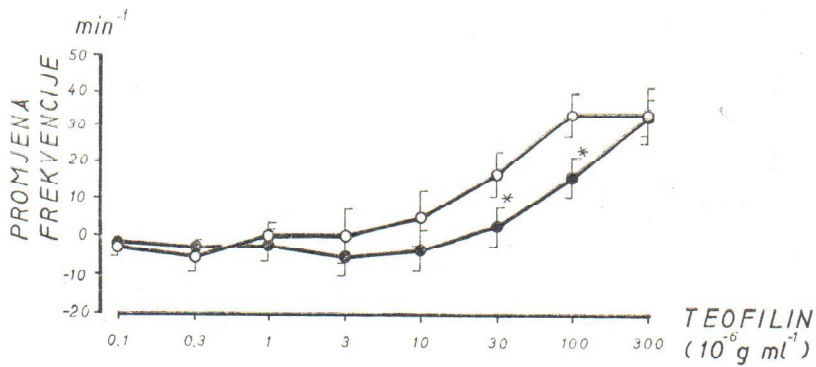
Sl. 1. Krivulje omjera doza: odgovor za kronotropno djelovanje kofeina (○) i teofilina (●) na izoliranim atrijima zamorčadi. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata, vertikalne linije prikazuju standardnu grešku, statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između vrijednosti za kofein i teofilin.



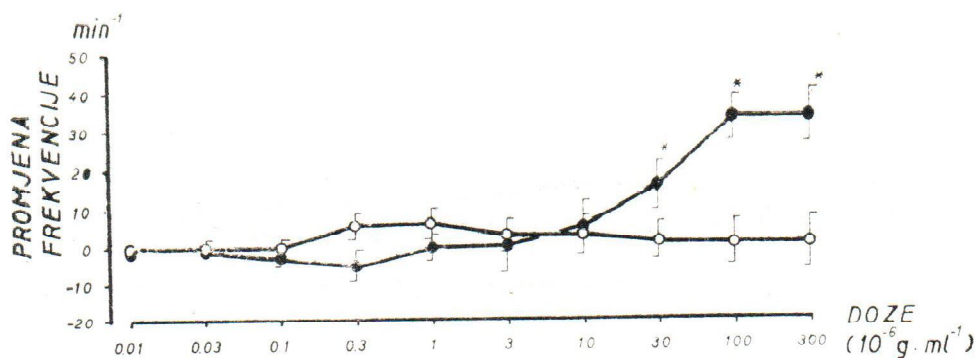
Sl. 2. Krivulje omjera doza: odgovor za kronotropno djelovanje kofeina na izoliranim atrijima reserpinizirane (●) (4 dana $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i. p.}$) i kontrolne zamorčadi (○). Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata, vertikalne linije označavaju standardnu grešku, * statistički značajna razlika ($P \leq 0,5$) između vrijednosti u reserpiniziranih i kontrolnih životinja.



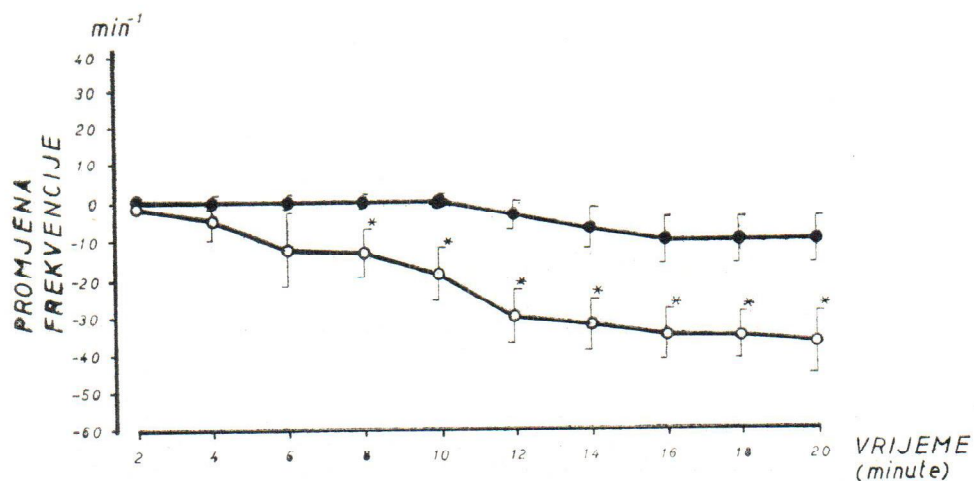
Sl. 3. Krivulje omjera doza: odgovor za kronotropno djelovanje teofilina na izoliranim atrijima reserpinizirane (4 dana $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i. p.) i kontrolne zamorčadi (○). Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata, vertikalne linije označavaju standardnu grešku, * statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između vrijednosti u reserpiniziranih i kontrolnih životinja.



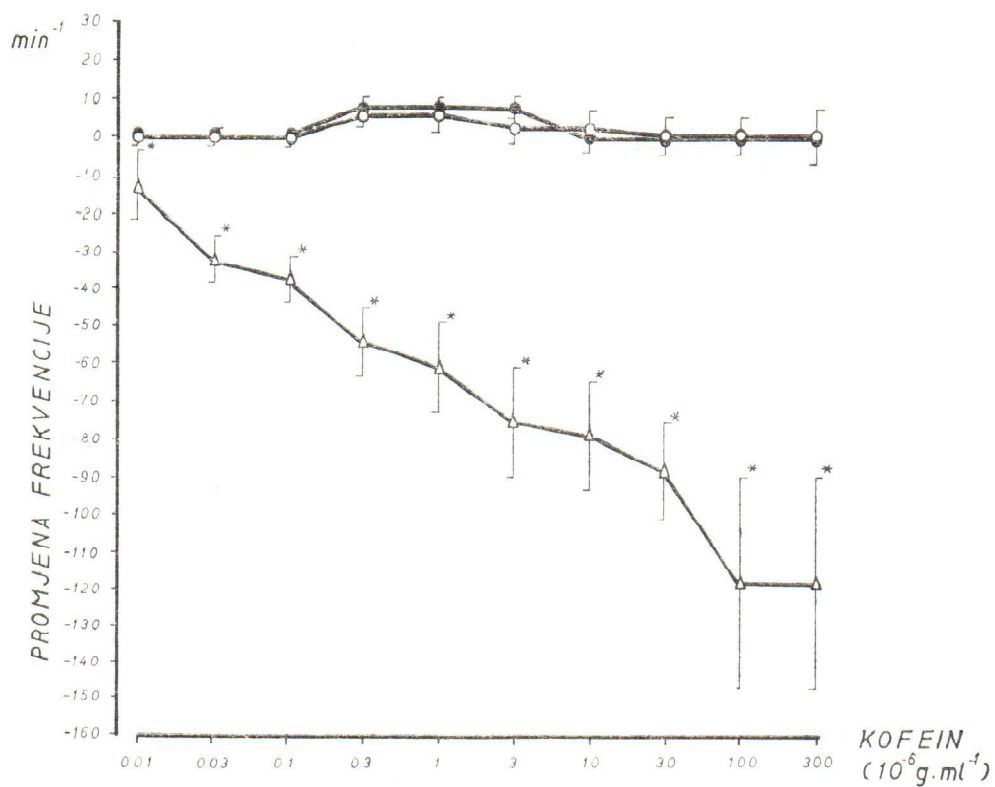
Sl. 4. Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje kofeina na izoliranim atrijima zamorčadi koja je dobivala alfa-metil DOPA (10 dana $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i. p.) i kontrolnih životinja (○). Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata, vertikalne linije prikazuju standardnu grešku, * statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između vrijednosti u životinja koje su dobivale alfa-metil DOPA i kontrolnih životinja.



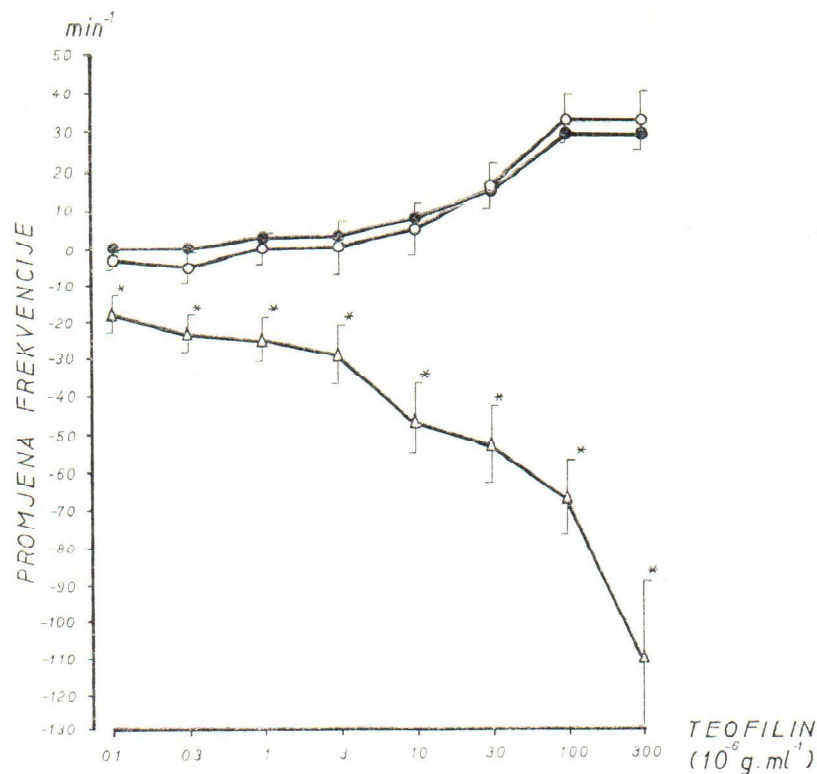
Sl. 5. Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje teofilina na izoliranim atrijima zamorčadi koja je dobivala alfa-metil DOPA (10 dana $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i. p.}$) (●) i kontrolnih životinja (○). Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata, vertikalne linije prikazuju standardnu grešku, * statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između vrijednosti u životinja koje su dobivale alfa metil DOPA i kontrolnih životinja



Sl. 6. Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje $10^{-7} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (○) i $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (●) propranolola na izoliranim atrijima zamorčadi. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata, vertikalne linije označavaju standardnu grešku. * statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između ispitivanih vrijednosti propranolola



Sl. 7. Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje kofeina u kontrolnim uvjetima (●), u prisutnosti $10^{-7} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ propranolola (○) i $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ propranolola (Δ). Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata a vertikalne linije označavaju standardnu grešku, * statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između ispitivanih vrijednosti u kontrole i ostalih grupa životinja



Sl. 8. Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje teofilina u kontrolnim uvjetima (●), u prisutnosti $10^{-7} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ propranolola (○) i $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ propranolola (△). Svaka točka prikazuje srednju vrijednost od deset eksperimenata a vertikalne linije označavaju standardnu grešku. * statistički značajna razlika ($P \leq 0,05$) između ispitivanih vrijednosti u kontrole i ostalih grupa životinja.

DISKUSIJA

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da kofein i teofilin u malim koncentracijama ne uzrokuju značajne promjene u frekvenciji kucanja izoliranih atrija zamorčadi. Kofein samo u koncentracijama između $10^{-7} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ — $10^{-5} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, a teofilin tek u prisutnosti najvećih ispitivanih koncentracija uzrokuje tahikardiju.

Na izoliranim atrijima štakora i kofein i teofilin (značajno jače) uzrokuju isključivo tahikardiju, čiji je maksimum nekoliko puta veći nego u zamorčadi (6). Ako bi pozitivni kronotropni efekt kofeina i teofilina bio

uzrokovan isključivo njihovim direktnim simpatomimetskim djelovanjem, onda bi te supstancije trebale da izazivaju veći pozitivni kronotropni učinak u zamorčadi nego u štakora jer tkivo atrijske štakora sadržava nekoliko puta manje kateholamina od tkiva atrijske zamorčadi (15). Međutim, nije tako.

S obzirom na to da je utok Ca^{++} u mitohondrije miokarda štakora pod utjecajem metilksantina manji nego u mitohondrije zamorčadi (14), preostaje više Ca^{++} izvan mitohondrija štakora, pa ovi ioni mogu pokrenuti kontraktilne mehanizme u miokardu. To je vjerojatno i uzrok snažnijeg kronotropnog efekta ispitivanih metilksantina na srce štakora nego na srce zamorčadi.

Krivulje omjera doza : odgovor za kronotropno djelovanje metilksantina na izoliranim atrijskim reserpinizirane zamorčadi (bez endogenih depoa kateholamina) (16, 17) pomaknute su udesno, ali nema značajne razlike u maksimumu kronotropne aktivnosti u odnosu na kontrolnu zamorčad. To pokazuje da je indirektna simpatomimetska aktivnost metilksantina samo jedna od komponenti njihove kronotropne aktivnosti, koja nije nužna za iskazivanje maksimuma te aktivnosti.

Na izoliranim atrijskim štakora, i teofilin i kofein također iskazuju indirektno simpatomimetsku aktivnost, ali za razliku prema zamorčadi ta je aktivnost nužna za iskazivanje maksimalnog pozitivnog kronotropnog djelovanja (1, 6).

U zamorčadi koja je dobivala alfa metil DOPA smanjeno je stimulirajuće djelovanje ispitivanih metilksantina na kucanje izoliranih atrijske. Slični su rezultati dobiveni u štakora (6).

Alfa metil DOPA uzrokuje nastajanje »lažnog transmitera« metil NA i inhibiciju DOPA dekarboksilaze (18, 19). Zato valja očekivati da će u životinja koje su dobivale alfa-metil DOPA metilksantini svojom indirektnom simpatomimetskom aktivnošću pokretati slabije kronotropno djelovanje no u kontrolne skupine.

Propranolol, neselektivni blokator beta adrenergičkih receptora (20, 21, 22) izaziva, ovisno o koncentraciji i vremenskoj dužini kontakta s izoliranim atrijskim zamorčadi, sve veću bradikardiju. U prisutnosti propranolola u koncentraciji od 10^{-7} g · ml⁻¹, kronotropna aktivnost ispitivanih metilksantina je jednaka kao i u kontrolnim uvjetima. Međutim u prisutnosti 10^{-6} g · ml⁻¹ propranolola, ispitivani metilksantini ovisno o koncentraciji, izazivaju sve izraženiju bradikardiju. Ti su rezultati slični rezultatima u štakora (1, 6).

Jednokratno davanje propranolola ne izaziva značajne promjene u sadržaju kateholamina u srcu (18). Međutim, propranolol sprečava razmjenu (ulazak i izlazak) Ca^{++} u endoplazmatskom retikulumu miokarda (10, 13). Zato smatramo da je utjecaj propranolola i ispitivanih metilksantina na metabolizam Ca^{++} u srcu jedan od faktora koji uvjetuju nastajanje opisanog kronotropnog efekta metilksantina u prisutnosti propranolola.

ZAKLJUČAK

Kofein uzrokuje slabu, a teofilin izraženu tahikardiju na izoliranom atriju zamorčadi. Kofein i teofilin ostvaruju indirektnu simpatomimetsku aktivnost, koja nije isključiv uzrok njihova pozitivnog kronotropnog djelovanja.

Za ostvarivanje kronotropne aktivnosti ispitivanih metilksantina vjerojatno je značajan i njihov utjecaj na razmjenu Ca^{++} u stanicama atrija srca.

Literatura

1. Atanacković, D., Simonić, A.: *Medicina*, 1 (1978) 5.
2. De Gubareff, T., Sleator, W. jr.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 148 (1965) 202
3. McNeill, J. H., Nassar, M., Brody, M. T.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 163 (1969) 234.
4. Snider, R. S., Waldock, B.: *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.*, 281 (1974) 257.
5. Westfal, D. P., Fleming, W. E.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 159 (1968) 98.
6. Atanacković, D., Simonić, A.: *Medicina*, 1 (1978) 9.
7. Strubel, J., Siege, S. C. P.: *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.*, 260 (1968) 209.
8. Kukovetz, W. A., Poch, G.: *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.*, 243 (1962) 343.
9. Butcher, R. W., Sutherland, E. E.: *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1244.
10. Breckenridge, B.: *An. Rew. Pharmacol.*, 10 (1970) 19.
11. Nayler, W. G., Hasker, J. R.: *Am. J. Physiol.*, 211 (1966) 960.
12. Nayler, W. G.: *Amer. Heart. J.*, 73 (1967) 3.
13. Nayler, W. G., Stone, J., Carson, V., Mc Innes, Mack, V., Lowe, T. E.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 165 (1969) 225.
14. Nayler, W. G., Berry, D.: *J. Mol. Cell. Cardio.*, 7 (1975) 385.
15. Boadle, B., Hughes, J., Roth, R. H.: *Nature*, 222 (1969) 987.
16. Carlsson, A.: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 19, p. p. 529, Berlin—Heidelberg—New York: Springer, (1966)
17. Giachetti, A., Shere, P. A.: *Naunyn Schmiederberg's Arch. Pharmakol.*, 228 (1975) 345.
18. Day, M. D., Roach, A. G., Whiting, R. L.: *Europ. J. Pharmacol.*, 21 (1973) 271.
19. Malik, K. U., Muscholl, E.: *Arzneimittel-Forsch.*, 7 (1969) 1111.
20. Burges, R. A., Blackburn, K. J.: *Nature New Biol.*, 235 (1972) 249.
21. Dawis, G. W., Mc Donald, D. C., Mason, D. F. J.: *Br. J. Pharmacol.*, 37 (1969) 338.
22. Buckley, G. A., Jordan, C. C.: *Br. J. Pharmacol.*, 37 (1969) 522.

Summary

THE MECHANISM OF CHRONOTROPIC ACTIVITY OF CAFFEINE
AND THEOPHYLLINE IN GUINEA PIGS

The chronotropic activity of caffeine and theophylline on the isolated right atrium of the guinea pig was examined. Theophylline caused a significant and caffeine only a slight increase in the atrial rate. Reserpine and alpha methyl DOPA diminished the chronotropic activity of the investigated methyl xanthines. Propranolol caused a decrease in the atrial rate. Caffeine and theophylline potentiated the negative chronotropic activity of propranolol.

*Institute of Pharmacology,
Medical Faculty, Rijeka*

*Received for publication
October 22, 1979.*