

ВИСШ МЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ — ВАРНА

Катедра по биохимия

Ръководител: доцент Д. Калицин

## ВЛИЯНИЕ НА КОФЕИНОВОТО ВЪЗБУЖДАНЕ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА КРЪВНАТА И ПАНКРЕАТИЧНАТА АМИЛАЗА У БЕЛИ МЪЖКИ ПЛЪХОВЕ

Д. С. Калицин, С. И. Бояджиев

Разкриването на механизма, по който се осъществява нервно-хуморалната регулация на обмяната в живия организъм, на връзката между действието на централната нервна система и другите регулаторни механизми — ензимите и хормоните, е една от най-важните задачи на съвременната биохимия.

Особено обещаващ път към разрешаване на този проблем се явява методът на изследване отделните звена на обменните процеси на фона на експериментално предизвикани различни функционални състояния на централната нервна система (10).

Ние си поставихме задачата да изследваме влиянието на мъжките полови хормони върху активността на амилазата в кръвта и в задстомашната жлеза у плъхове при процес на възбуждане в централната нервна система, предизвикан от кофеин.

Известно е от изследвания през последните години, че мъжките полови хормони оказват въздействие върху активността на някои ензими:  $\alpha$ -аминокисела оксидаза (25), сукциноксидаза (19), каталаза (11) и др. Но посочените автори не показват връзката между ензимите и половите хормони, от една страна, и състоянието на централната нервна система, от друга.

В предишни изследвания един от авторите на настоящата статия (6, 7, 9) установил, че мъжките полови хормони — по-точно тестостеронът, оказват активизиращо влияние върху амилазата в кръвта и задстомашната жлеза у мъжки плъхове, осъществено чрез централната нервна система, което влияние не може да се прояви при процес на задържане в същата, а се проявява само при състояние на физиологична активност.

В литературата не намерихме данни за влиянието на кофеина върху активността на амилазата (*in vivo*). Известни са ни само проучванията на Венсент и Лагрьо (24), които установяват *in vitro* инхибиращо влияние на кофеина (при концентрации, по-високи от M/200) върху слюнчена, задстомашна и малцова амилаза.

## Методика

Изследванията бяха проведени с мъжки бели плъхове приблизително на еднаква възраст и с тегло от 170 до 210 грама. Изследваните животни бяха разделени в следните 2 серии:

*I серия:* контролни — 15 плъха.

*II серия:* третирани с кофеин — 14 плъха.

Кофеинът се инжектираше подкожно в доза 15 мг/1000 г тегло. Такава доза не предизвиква токсични явления у плъхове (15).

Средно до 3 часа след инжектиране на кофеина наблюдавахме у плъховете явления на възбуждане, изразяващи се в повишена двигателна активност и в по-остро реагиране на външни дразнения. Опитните и контролните плъхове бяха подложени на предимно въглехидратна диета, описана в предишна наша работа (8).

Изследванията на Рейд (21) сапоказали, че активността на амилазата в кръвта е различна в различните часове след приемане на храна. Затова, преди да бъдат убити, и контролните, и опитните животни се оставяха гладни в продължение на 15 часа. Животните се убиваха 3 часа след инжектиране на кофеиновия разтвор в един и същ час на денонощието (11 часа), за да се избягнат периодичните колебания на амилазната активност, съответстващи на 24-часовата периодична дейност на храносмилателния апарат.

Кръвта за изследване се вземаше след декапитиране на плъховете възможно най-бързо поради лесната ѝ съсирваемост. Също така веднага се изваждаше и задстомашната жлеза и се приготвяше хомогенат с дестилирана вода при 0°C (съотношение 1:100).

Амилазната активност се определяше по увеличаването на редуциращите вещества в кръвта след инкубация със скорбяла по метода на Енгелхард и Герчук (4), а в панкреатичния хомогенат по метода на Балцер и Шустер (12). Двата метода бяха модифицирани от Калицин (7 и 8) съобразно извънредно високата активност на амилазата у плъхове (в кръвта на плъх е установена около 40 пъти по-висока амилазна активност, отколкото в кръвта на човек).

За всеки опит вземахме по две паралелни проби (както от кръвта, така и от панкреатичния хомогенат) за инкубация; от всяка проба имахме по два пълни и два контролни опита, така че полученият резултат представлява средна аритметична стойност от 4 паралелни определения.

Амилазната активност се изразяваше чрез разликата между количеството на редуциращите вещества след и до инкубация със скорбяла, т. е. по разликата между опитната и контролната проба.

## Резултати от изследванията

Получените данни бяха обработени по методите на вариционната статистика (1, 2), като резултатите са представени на таблиците 1 и 2.

На таблица 1 са представени данните за амилазната активност в кръвта на 15 контролни и 14 инжектирани с кофеин (15 мг на 1000 г тегло) мъжки плъхове.

Данните от таблицата показват, че активността на амилазата в кръвта на мъжки плъхове, инжектирани с кофеин в доза 15 мг/1000 г тегло, е с 35,8% по-висока, отколкото у контролните плъхове.

Установените различия са статистически достоверни, изчислени при ниво на вероятност  $p=0,05(2)$ .

От посочените на таблица 1 стандартни грешки на средните аритметични стойности се вижда, че индивидуалните колебания у опитните плъхове, инжектирани с кофеин, са значително по-големи, отколкото у контролните.

За контролните плъхове средният резултат е  $109,3 \pm 5,8$ , а за опитните  $148,5 \pm 11,4$ .

Опитните резултати от изследванията на амилазната активност в панкреатични хомогенати от контролни и инжектирани с кофеин плъхове са представени на таблица 2.

Обработката на резултатите от подложените на кофениново въздействие и от контролните плъхове показва, че активността на панкреатичната амилаза не се изменя при процес на възбуждане в централната нервна система, предизвикано от кофеин.

Намерените малки разлики са статистически недостоверни.

Индивидуалните колебания при двете серии опити са почти от еднакъв порядък и са значително по-малки от тези на амилазната активност в кръвта.

Таблица 1  
Амилазна активност в кръвта на контролни и инжектирани с кофеин (15 мг/1000 г) мъжки плъхове

Инкубация 2 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ ;  $p\text{H}=6,5$   
Амилазната активност се изразява чрез увеличаването на редуциращите вещества в милиграми под въздействието на амилазата, съдържаща се в 1 мл кръв

№ на опита	Увеличаване на редуциращите вещества (в мг/мл) в кръвта от:	
	контролни животни	инжектирани с кофеин животни
1	104,8	188,0
2	96,8	170,4
3	136,8	96,8
4	142,8	167,6
5	82,4	118,4
6	75,8	204,8
7	109,6	91,2
8	147,6	231,6
9	82,8	150,4
10	125,8	96,4
11	96,4	135,0
12	95,0	141,5
13	131,6	122,3
14	86,2	164,5
15	126,4	—
$\bar{X}$	109,3	148,5
$\pm S$	21,3	42,5
$\pm S\bar{X}$	5,8	11,4

### Обсъждане на резултатите

Намерените значително по-големи индивидуални колебания в серията на опитните (т. е. инжектираните с кофеин) плъхове в сравнение с контролните (вж. таблица 1) бихме могли да обясним с различното индивидуално реагиране спрямо кофениновото въздействие, обусловено от различните типове нервна система на отделните животни.

Резултатите от таблица 1 показват, че кофеинът оказва забележимо въздействие върху амилазната активност в кръвта на мъжките плъхове — у инжектираните с кофеин плъхове активността е с 35,8% по-висока, отколкото у контролните.

Предполагаме, че това повишение на активността на амилазата се явява като резултат на сложно нервно-хуморално влияние от страна на централната нервна система и половите хормони върху амилазата.

Ние допускаме, че използваната от нас доза на кофеина—15 мг/1000 г тегло, се движи в границите на оптималните концентрации за създаване на

Амилазна активност в панкреатични хомогенати от контролни и инжектирани с кофеин (15 мг/1000 г) мъжки плъхове

Инкубация 30 минути при 37°C; pH=6,8

Амилазната активност се изразява чрез увеличаване на редуцираните вещества в мг под въздействието на амилазата, съдържаща се в 1 мг свежа панкреатична тъкан

№ на опита	Увеличаване на редуцираните вещества в мг/1 мг свежа тъкан от:	
	контролни животни	инжектирани с кофеин животни
1	22,73	21,48
2	21,38	20,03
3	22,05	22,89
4	19,98	17,89
5	19,98	20,36
6	20,25	20,70
7	22,05	22,95
8	21,38	16,53
9	21,49	19,46
10	22,28	19,08
11	23,96	21,48
12	20,59	22,15
13	20,59	21,95
14	21,94	22,20
15	21,70	—
$\bar{X}$	21,43	20,65
$\pm S$	1,10	1,90
$\pm S\bar{X}$	0,41	0,50

Забележка:  $\bar{X}$  = средна аритметична стойност от резултатите на отделните опити  
 $\pm S$  = средно квадратичноотклонение на отделния опит  
 $\pm S\bar{X}$  = стандартна грешка на средната аритметична

по-силно, отколкото у контролните, нетретирани с кофеин плъхове.

Така бихме могли да предположим със сигурност, че при използваната доза — 15 мг/1000 г, кофеинът не упражнява пряко влияние върху амилазната активност, а такова посредством централната нервна система и полови хормони.

По отношение на панкреатичната амилазна активност на мъжки плъхове (вж. таблица 2) не се установяват различия у третирани с кофеин в сравнение с контролните плъхове.

Въз основа на получените резултати бихме могли да допуснем по-слабо действие на кофеина, осъществено посредством мъжките полови хормони и централната нервна система, върху панкреатичната амилаза, отколкото върху амилазата в кръвта.

Би могло да се предположи, че амилазата в кръвта е подложена на по-силно въздействие от страна на половите хормони, отколкото амилазата в задстомашната жлеза.

възбуден процес в централната нервна система, като намалява скрития период на рефлексите (5).

Възбудният процес създаден в кората под действието на кофеина, ирадира в гръбначния мозък и хипофизата, които от своя страна са свързани с тестисите съответно по неврогенен и хуморален път. Следва по-усилено отделяне на полови хормони, които действуват активиращо върху амилазата (7 и 2).

Един от авторите на настоящата статия в предишна своя работа е установил, че активността на амилазата в кръвта на мъжки плъхове е по-висока, отколкото у женски плъхове (7). У кастрирани мъжки плъхове амилазната активност спада и след допълнително вкарване на тестостеронпропионат активността се доближава значително до нормата (9). Освен това установено е (7), че активиращото действие на мъжките полови хормони не се проявява при процес на задържане в централната нервна система, а само при състояние на физиологична активност в същата.

Настоящите изследвания показват, че при процес на възбуждане в централната нервна система, предизвикан от кофеин, активиращото действие на мъжките полови хормони е още

Резултатите от сегашния опит са в съгласие с предишни наши изследвания (7), според които различията в амилазната активност на кръвта у мъжки и женски плъхове са значително по-големи (у мъжките активността е с 49% по-висока), отколкото различията в активността на панкреатичната амилаза (активността на панкреатичната амилаза у мъжки плъхове е с 16% по-висока).

### Изводи

Проведените от нас изследвания върху амилазната активност в кръвта и задстомашната жлеза на 15 контролни и 14 инжектирани с кофеин (15 мг/1000 г тегло) мъжки бели плъхове показаха следното:

1. При състояние на възбуждане в централната нервна система, предизвикано от кофеин в доза 15 мг/1000 г тегло, активността на амилазата в кръвта на мъжки бели плъхове се повишава с 35,8% в сравнение с активността у контролните животни: амилазна активност у плъхове, инжектирани с кофеин—148,5±11,4 мг/1 мл; амилазна активност у контролните плъхове—109,8±5,8 мг/1 мл.

2. Индивидуалните колебания в серията третиранни с кофеин плъхове са значително по-големи, отколкото в серията контролни животни.

3. Същата доза кофеин не предизвиква изменение в активността на панкреатичната амилаза у изследваните плъхове.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Барлоу Р.: Введение в химическую фармакологию, перев. с. англ. ИНЛ, Москва 1959. — 2. Беленький М. Д.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта Изд. АН ЛСССР, 1959. — 3. Быков К. М., Давидов Г. М.: Секреторная деятельность панкреатической железы у человека; Нервно-гуморальная регуляция деятельности пищеварительного аппарата человека, т. 1, с. 19, 1935, цит. по Комаров Ф. И. — Секреторная деятельность пищеварительных желез у человека во время сна, Л., Медгиз, с. 84, 80, 1953. — 4. Энгельгардт Б. А. и Герчук М.: Журн. exper. биол. и медиц., № 3, 1926, в кн. Балаховский С. Д. и Балаховский И. С. — Методы химич. анализа крови, Медгиз, 622, 1953. — 5. Закусов В. В.: Фармакология нервной системы, Медгиз, 1953. — 6. Калицин Д. С.: Половые различия в углеводном обмене и амилазная активност в крови и панкреасе крыс при длительном мединаловом сне, V Междунар. биохим. конгресс, Рефераты секционных сообщений, II том, секция 16, 42, с. 169, изд. АН СССР, Москва, 1961 — 7. Калицин Д. С.: Различия в активността на амилазата в кръвта и панкреаса на мъжки и женски бели плъхове, подложени на продължителен мединалов сън, Изв. на Института по физиология при БАН, сер. експерим. биол. и мед. (под печат). — 8. Калицин Д. С.: Амилазна активност в панкреатични хомогенати от женски плъхове, подложени на продължителен мединалов сън, Научни трудове на ВМИ — София, експерим. теорет. катедри (под печат). — 9. Калицин Д. С.: Влияние на кастрирането и тестостеронпропионат върху амилазната активност в кръвта на бодърствуващи и подложени на продължителен мединалов сън мъжки бели плъхове, Научни трудове на ВМИ — Варна, том I, свитък I, 1962. — 10. Паллади А. В.: Функционална биохимия на главния мозък, Изв. на отд. по биол. и мед. н., Бълг. АН, серия експеримент. биол. и мед., № 2, 3—25, 1957. — 11. Adams D. H.: Hormonal factors influencing liver catalase activity in mice, Testicular and adrenal factors; Biochimic., J. 50, p. 486—493, 1952. — 12. Balzer E. U., Schuster: Eine titrimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der stärkeerzuckerkennenden Kraft des Duodenalsaftes, Klin. Wschr., 26, Heft 35/36, p. 559—561, 1948. — 13. Challis T., Reid E., Hinton A. G.: Gastroenterology, 33, No 5,



- p. 818—822, 1957. — 14. Dreolog D. A., Rosenthal W. K., Kass M. a. Janowitz H. D.: Am. J. digest. diss., No 4, 731, 1959. — 15. Druckrey H., Schreiber U. E.: Die Wirkung des Coffeins auf die Zellteilung und das Wachstum, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 188, p. 208—214, 1938, no Ber. ges. Phys. u. exp. Pharm., 106, 671, 1938. — 16. Handley C. A. and Ensherg D. L.: Anestheticsiology, 6, 651, 1945. — 17. Holek H. G. O.: Dosage of drugs for rats, в кн: Faris E. Y. and Griffith Y. D. (ed.) — The rat in laboratory investigation, Philadelphia, Lippincott, 1949, p. 329, no Drill V A A, Pharmacology in medicine, 2 ed., New York, Toronto, London, 1958. — 18. Ivanow W. und Basilevič J.: Die Blutfermente und die periodische Tätigkeit des Verdauungsapparates; Ukrainski medicin vesti, Jg. No 3, p. 92—97, no Ber. 38, 1927, p. 188, 1926. — 19. Kochakian C. D. Reed A. und Eischeid M.: Amer. J. Physiol., 177, p. 413, 1954; ит. no Richterich R.: Enzymopathologie, Enzyme in Klinik und Forschung, Berlin, Springer, XV, p. 703, 1958. — 20. Loeschke A.: Das diastatische Ferment des Blutes seine Physiologie und seine Klinische Bedeutung im Kindesalter, Ib. Kinderheilk, 146, p. 133—175, 1936, no Ber. 98, 323, 1937. — 21. Reid C.: Diastase activity in blood and urine, Brit. J. of exp. Pathol., Bd. 6, No 6, 1925, p. 314—326, no Ber., 35, p. 304, 1926. — 22. Tuba J. A, Wiberg G. S.: On rat serum amylase, J. Studies in normal and the alloxan diabetic animal., Canad. J. Med. Sci., vol. 31, No 5, p. 377—386, 1953. — 23. Utewski A., Epstein S., u. Ossinska W.: Klin. Wschr., 1., p. 388—389, 1933. — 24. Vincent D. et Largren R.: Action de la caféine sur les amylases, C. r. soc. Biol. (Paris)-vol. 144, p. 1658—1660, 1950. — 25. Williams H. G., Aschman: Changes in the enzymatic constitution of the ventral prostate gland induced by androgenic hormones, Endocrinology, 54, p. 121—129, 1954.

ВЫСШИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ — ВАРНА

Кафедра биохимии

Руководитель кафедрой: доцент Д. Калицин

## ВЛИЯНИЕ КОФЕИНОВОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ КРОВИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БЕЛЫХ КРЫС МУЖСКОГО ПОЛА

Д. С. Калицин, С. И. Бояджиев

### РЕЗЮМЕ

Авторы исследовали активность амилазы крови и поджелудочной железы у 29 белых крыс мужского пола, разделенных на две группы — контрольная и подопытная, которым вводился кофеин по 15 мг/1000 г веса подкожно. У подопытных животных наблюдаются в среднем через 3 часа после введения кофеина явления возбуждения — повышенная двигательная активность и более острая реакция на внешние раздражения. Авторы принимают, что использованная доза кофеина находится в пределах оптимальных концентраций для создания процесса возбуждения в центральной нервной системе.

Активность амилазы в крови определяется по методу Энгельгардта и Герчука, а в гомогенате из поджелудочной железы — по методу Балцера и Шустера, модифицированных в соответствии с очень высокой активностью энзима у крыс (в крови крысы амилаза приблизительно в 40 раз активнее, чем в крови человека).

При состоянии возбуждения центральной нервной системы, вызванного кофеином, устанавливается повышение активности амилазы в крови крыс

мужского пола на 35,8%, в сравнении с активностью у контрольных животных. Обнаруженные различия статистически достоверны. Допускается, что созданный в центральной нервной системе, под воздействием кофеина, процесс возбуждения вызывает более усиленное выделение половых гормонов из тестисов, которые действуют активирующе на амилазу.

В серии животных, которым вводился кофеин, устанавливаются более выраженные колебания активности амилазы в крови в сравнении с контрольными животными. Авторы допускают, что это различие является результатом различных типов нервной системы у исследованных животных.

Статистическая обработка результатов показывает, что панкреатическая амилаза не изменяется при наличии процесса возбуждения в центральной нервной системе, вызванного кофеином. Допускается более слабое воздействие кофеина, осуществляемое посредством центральной нервной системы и мужских половых гормонов, на амилазу в поджелудочной железе, чем на амилазу в крови.

HIGHER MEDICAL INSTITUTE — VARNA

Chair of Biochemistry

Chief of the Chair: Assist. prof. D. S. Kalitzin

#### THE INFLUENCE OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM CAFFEINE EXCITATION ON THE BLOOD ACTIVITY AND PANCREATIC AMYLASE IN MALE ALBINO RATS

*D. S. Kalitzin and S. I. Bojadgiev*

#### SUMMARY

The amylase activity in the blood and pancreas of 29 male albino rats is examined. The animals are divided into two groups — controls and test-animals, subcutaneously injected by 15 mg caffeine per 1000 gr., b. w. In the test-animals, three hours after the caffeine injection excitation phenomena were recorded: increased motor activity, and a sharper reaction to outside stimuli. It is accepted, that the caffeine dose used in this case, varies within the limits of maximal concentrations so as to create a process of excitation in the central nervous system.

The amylase blood activity is determined after Engelhardt and Gerchuck's method, and that of pancreatic homogenate preparation after Valtzer and Shuster's method — modified in accordance with the rather high enzyme activity in rats (the amylase in rat's blood is nearly 40 times more-active, than it is in the human blood).

In the state of central nervous system excitation caused by caffeine, it is established in male albino rats, an increase in the amylase blood activity by 35,8%, so as compared with the activity in the controls. The differences discovered are statistically authentic.

It is considered, that the excitation process in the central nervous system caused by caffeine is possibly responsible for a greater testicular hormone secretions which stimulate the amylase activity.

In the group of the injected test-animals so as compared with the controls are established greater fluctuations of the amylase blood activity. It is considered, that the difference as regards caffeine effect is due to different types of central nervous system of the test-animals.

The statistical treatment of the results indicate, that pancreatic amylase does not change in central nervous system excitation caused by caffeine. It is considered that caffeine effect on pancreatic amylase exercised through the agency of the central nervous system and male sexual hormones is weaker than its effect on blood amylase.