

Effects of Insulin Hypoglycaemia on the Adrenal Medulla of the Hamster

KLEIN and KRACHT¹ have observed that insulin shock in the golden hamster causes degranulation and vacuolization of the adrenal chromaffin cells. Recently, however, MONNERON et al.² and MONNERON³ reported negative histochemical results after the administration of high doses of insulin. At present, no quantitative studies concerning this subject have been reported.

In this paper the modifications in the adrenal and plasma catecholamines produced by insulin hypoglycaemia are presented. Considering that the hamster is a hibernating mammal, we also thought it of interest to investigate the role played by temperature modifications in the adrenal response to insulin induced hypoglycaemia.

Material and methods. Eighty-four male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) weighing 70–100 g were used. The animals were kept in an air-conditioned room at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. During the experiments the room temperature was modified to the required level.

Crystalline insulin (regular insulin, Elli Lilly, 40 U/cm³) was employed in all the experiments. The hormone was injected subcutaneously after an 18-h fasting period. Controls were done simultaneously. The animals were sacrificed by decapitation and then bled. The plasma of each group of 3–4 animals was pooled and the con-

centration of adrenaline and noradrenaline was evaluated. Blood glucose and adrenal catecholamines were determined in each hamster. The fluorometric methods of COHEN and GOLDENBERG⁴ for plasma catecholamines and of EULER and FLODING⁵ for adrenal catecholamines were employed. Blood glucose was determined with the micromethod of KING and GARNER⁶.

Results. (a) Experiments at 19°C : The injection of 4 units of insulin per 100 g of body weight, produced hypoglycaemia and shock in all the animals. Table I shows that in the 3rd and 5th h after injection, the glycaemia drops to minimum values. The concentration of noradrenaline in plasma was highest after 1.5 h and the adrenaline increased in the 3rd h. The content of both catecholamines in the adrenal gland decreased 3 h after injection.

¹ U. KLEIN and J. KRACHT, *Endokrinologie* 35, 259 (1958).

² A. MONNERON, D. PICARD, and G. VITRY, *J. Physiol.* 55, 302 (1963).

³ ARIANNE MONNERON, *Variations histologiques expérimentales de la Médullo-Surrénale du Hamster*, Thèse, Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille (1963).

⁴ G. COHEN and M. GOLDENBERG, *J. Neurochem.* 2, 71 (1957).

⁵ U. V. VON EULER and I. FLODING, *Acta physiol. scand.* 33, Suppl. 118 (1955).

⁶ E. J. KING and R. J. GARNER, *J. clin. Pathol.* 1, 30 (1947).

Table I. Effects of insulin hypoglycaemia in hamsters at 19°C , mean values $\pm$ standard error

Group	Number of animals	Blood glucose mg/100 ml	Plasma		Adrenal	
			A ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	NA	A (mg/g)	NA
Controls	19	84.7 ± 3.0	0.25 ^a	1.07 ^b	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.03
Insulin 4 U/100 g						
1.5 h	6	33.0 ± 2.8^a	0.25	1.91	0.27 ± 0.03	0.23 ± 0.02
3 h	5	20.0 ± 2.4^a	1.14	1.01	0.10 ± 0.02^c	0.07 ± 0.01^a
5 h	18	23.0 ± 0.7^a	0.34	1.04	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.02^c
8 h	4	51.0 ± 4.7^a	0.23	0.95	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.04
Insulin 2 U/100 g						
3 h	4	20.5 ± 2.9^a	–	–	0.04 ± 0.01^a	0.12 ± 0.04

^a Range: 0.19–0.32 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. ^b Range: 0.6–1.4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. ^c Statistically significant $P < 0.05$. ^d Statistically significant $P < 0.01$. A, adrenaline. NA, noradrenaline. –, not measured.

Table II. Effects of insulin hypoglycaemia in hamsters at 26°C , mean values $\pm$ standard error

Group	Number of animals	Blood glucose mg/100 ml	Plasma		Adrenal	
			A ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	NA	A (mg/g)	NA
Controls	10	79.1 ± 0.6	0.19	1.16	0.16 ± 0.01	0.26 ± 0.03
Insulin 4 U/100 g						
3 h	4	14.0 ± 3.4^b	–	–	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.01
5 h	10	29.6 ± 1.7^b	0.0	0.89	0.12 ± 0.01	0.21 ± 0.07
Insulin 8 U/100 g						
3 h	4	20.7 ± 1.7^b	–	–	0.01 ± 0.01^a	0.09 ± 0.06

^a Statistically significant $P < 0.05$. ^b Statistically significant $P < 0.01$. A, adrenaline. NA, noradrenaline. –, not measured.

Another group of hamsters was injected with 2 U/100 g of insulin and sacrificed 3 h later. The glycaemia was similar to that produced by 4 U/100 g. In this experiment the adrenaline content of the adrenal gland was reduced, but the noradrenaline content did not vary (Table I).

(b) Experiments at 26°C: The hypoglycaemic response to insulin (4 U/100 g) in two groups of hamsters, was comparable to that observed in foregoing experiments performed at 19°C, but no shock or seizures were produced. The adrenaline and noradrenaline content in the adrenal glands or in plasma were not modified 3 or 5 h after the insulin injection (Table II). The noradrenaline concentration in the adrenals of the control groups studied at 26°C was higher than in the groups studied at 19°C (see Table I). A reduction of adrenaline in the adrenal gland was produced with the injection of 8 U/100 g of insulin. In this group, shock and seizures were observed.

To summarize the results obtained in our experiments, one may postulate that the increased adrenal medullary secretion during insulin hypoglycaemia in hamsters, is a temperature-dependent response. A reduction of the en-

vironmental temperature permits a greater catecholamine secretion with lower doses of insulin. The hypoglycaemic response to insulin, however, was similar in the animals studied at 19°C or at 26°C.

Résumé. Pendant l'hypoglycémie insulinaire (4 U/100 g), le hamster maintenu à 19°C présente une augmentation de l'adrénaline et de la noradrénaline plasmatiques, ainsi qu'une réduction de ces deux catécholamines dans les surrénales. Maintenu à 26°C, l'hypoglycémie se produit aussi bien avec 4 U/100 g d'insuline mais il n'y a pas de changements de l'adrénaline et noradrénaline du plasma et des surrénales. Pour obtenir des modifications, il est nécessaire d'augmenter la dose d'insuline à 8 U/100 g. En conclusion, la température extérieure a une influence marquée sur la réponse médullo-surrénale de l'hypoglycémie insulinaire.

A. O. DONOSO and ANA MARÍA BISCARDI

*Instituto de Biología y Medicina Experimental,
Obligado 2490, Buenos Aires (Argentina), June 16, 1964.*

Azione diabetogena dei derivati benzotiodiazinici nel gatto

L'azione diabetogena che i benzotiodiazinici ed in particolare il diazossido hanno manifestato in clinica¹ non si è potuta sinora dimostrare sperimentalmente; noi stessi, in più di 80 ratti trattati per 20 giorni *pro die* con 200 mg/kg di diazossido assieme a 0,5 mg/kg di clorometiazide, non eravamo riusciti ad ottenere variazioni della glicemia e dell'amilasi. Si è quindi ricercata l'azione diabetogena dei benzotiodiazinici nel gatto (in totale 44 animali), una specie che non risultava essersi impiegata per queste prove. I primi due gatti, trattati s.c. *pro die* con 20 mg/kg di diazossido e 0,3 mg/kg di clorometiazide, manifestarono dopo 1-2 ore vomito e anoressia e morirono dopo 3-4 giorni senza presentare all'autopsia segni particolari. Altri 2 gatti, iniettati s.c. *pro die* con 0,3 mg/kg di clorometiazide assieme a dosi di diazossido di 2 mg/kg nei primi 5 giorni e quindi di 4 mg/kg, 6 mg/kg, sino a 10 mg/kg, manifestarono dopo 11 giorni di trattamento un aumento del glucosio ematico (test della glucosio-ossidasi) del 205% rispetto ai valori iniziali. Le prove successive vennero condotte secondo lo schema che si riporta qui di seguito assieme ai valori glicemici medi di ogni gruppo, prima e dopo 12-15 giorni di trattamento. (1) Gatti di controllo, non trattati (n. 10): glicemia da 98,3 a 97,9 mg%; aumento = 0%. (2) Gatti trattati con 0,3-0,5 mg/kg *pro die* di clorometiazide (n. 8): glicemia da 99,25 a 131,5 mg%; aumento = $32,5 \pm 9,04\%$. (3) Gatti trattati con 4-10 mg/kg *pro die* di diazossido (n. 10): glicemia da 92,7 a 123,4 mg%; aumento = $32,7 \pm 17,6\%$. (4) Gatti trattati con clorometiazide + diazossido sec. le dosi riportate (n. 11 animali); glicemia da 98,82 a 216,73 mg%; aumento = $219,32 \pm 28,4\%$. Durante le prove morirono 5 gatti, 3 del gruppo trattato col solo diazossido e 2 del gruppo trattato con diazossido + clorometiazide.

Conclusioni. Nel gatto si è ottenuta la dimostrazione sperimentale di quell'azione iperglicemica che il diazossido

ed i benzotiodiazinici diuretici hanno manifestato nelle prove cliniche. Anche nel gatto, così come sembra per l'uomo², l'associazione del diazossido con un benzotiodiazinico diuretico manifesta un effetto iperglicemico assai più intenso di quello indotto dai due derivati separatamente. È presumibile che per analogia con quanto accertato nella specie umana³, questa azione iperglicemica nel gatto sia la conseguenza di un effetto inibitore diretto sulle cellule pancreatiche. Il fatto che nel gatto il diazossido manifesta una tossicità assai più elevata di quella che si ha nel topo e nel ratto ($LD_{50} = 320$ e 530 mg/kg rispettivamente sec. ³ e ⁴) costituisce una conferma della opportunità che gli esami di tossicità vengano condotti comparativamente in diversi animali; nel caso in esame, il riscontro di un così rilevante divario di tossicità fra roditori e gatto avrebbe probabilmente indotto a dubitare sin dall'inizio dell'innoquità del diazossido per la specie umana.

Summary. Diaxoxide and chlormethiazide produced an evident hyperglycemia in cats and the two compounds together caused a much more marked effect. In cats, diaxoxide showed a specific toxicity, much higher than that in mice and rats (ratio about 1/100).

G. M. CARMINATI

Laboratori di Farmacologia della Società Italiana Prodotti Schering, Milano (Italia), il 28 maggio 1964.

- 1 N. SAMAN, C. T. DOLLERY e R. FRASER, *Lancet* 1963 ii, 1244.
- 2 C. T. DOLLERY, B. L. PENTECOST e N. A. SAMAN, *Lancet* 1962 i, 735.
- 3 A. A. RUBIN, F. E. ROTH, R. M. TAYLOR e H. ROSENKILDE, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 136, 344 (1962).
- 4 G. M. CARMINATI, *Arch. int. Pharmacodyn. Therap.* 143, 446 (1963).