

## Zum Einfluß von Äthanol auf die Zona glomerulosa und Zona fasciculata der Rattennebennierenrinde bei gleichzeitiger Belastung mit Insulin und hypertonerischer Kochsalzlösung

J. I. HIRVONEN, L. K. J. KARLSSON und K. OJALA

Physiologisches Institut (Vorstand: Prof. Dr. med. M. BERGSTRÖM)  
und Gerichtsmedizinisches Institut (Vorstand: Prof. Dr. med. U. UOTILA)  
der Universität Helsinki

Ein eingegangen am 15. März 1967

Mit biochemischen Methoden ist schon früher nachgewiesen worden, daß große Äthanolgaben bei intakten Tieren, z.B. Ratte, Hund und Meerschweinchen die Glucocorticoide in der Nebennierenrinde freimachen (u.a. KRUSIUS et al., ELLIS) und den Ascorbinsäure- und Cholesterolgehalt vermindern (SMITH). Nach reichlichem Genuß von Äthanol hat man auch Neigung zu hohen Kaliumwerten im Plasma konstatiert (RUBINI et al.), was direkt die Ausscheidung der Mineralcorticoide vermehrt (BLAIR-WEST et al.).

Die Verabreichung von Insulin hat Hypokaliämie im Gefolge, weil Kalium zusammen mit Glucose in die Zellen einströmt. Während der vom Insulin verursachten Hypoglykämie wird die Ausscheidung der Glucocorticoide und des Adrenalins schnell erhöht und damit das Zuckergleichgewicht wiederhergestellt. Im Vergleich zu Äthanol übt das Insulin also ähnlich geartete Effekte auf die Hormone der Nebennierenrinde aus.

Die vom Äthanol verursachten Veränderungen im Hormongleichgewicht sind häufiger aufgrund kurzfristiger Experimente bekannt geworden, während über Versuche von längerer Dauer nur wenig berichtet wird. HION-JON konnte in der Nebennierenrinde des Kaninchens sowohl Hyperplasie und Chromatophilie wie auch Kernlysis und andere Degenerationserscheinungen der Zona glomerulosa nach mehrwöchiger Äthanolverabreichung nachweisen. AUBERTIN hat in der Zona glomerulosa und fasciculata der Nebennierenrinde von Meerschweinchen, die 1—10 Monate lang Absinth erhalten hatten, reichlich Lipidvacuolen gesehen, was von ihm als starke Hyperplasie gedeutet wurde. Eine Alkoholmenge von 4 g/kg Körpergewicht pro Tag verminderte in 2 Monaten den Ascorbinsäure- und Cholesterolgehalt in der Rattennebennierenrinde (KALANT und CZAJA).

Im funktionellen Zustand der Nebennieren waren nach fortgesetzter, mittelschwerer Äthanolbelastung demnach Veränderungen zu erwarten. Auch die gleichzeitige Wirkung von Insulin und Äthanol wäre voraussichtlich interessant. Um einen Vergleichspunkt zu gewinnen, wurde das Experiment von BACCHUS mit hypertonerischer Kochsalzlösung wiederholt.

### Material und Methode

Insgesamt 106 männliche Ratten, eingeteilt in sieben Gruppen, wurden für den Versuch benutzt. Die Ratten lebten in der normalen Kolonie und bekamen Trockenfutter und Wasser *ad libidum*. Die Tiere wurden 14 Tage lang zweimal täglich behandelt.

1. *Äthanolgruppe*. 16 Ratten (Gewicht 180—200 g) bekamen 3% vom Körpergewicht 10%ige Äthanollösung (= 3 g/kg reines Äthanol) durch einen Magenschlauch.

2. *Äthanol-Kochsalzgruppe*. 17 Ratten (180—210 g) bekamen Lösung, die 10% Äthanol und 5% NaCl enthielt, 3% vom Körpergewicht durch den Magenschlauch.

3. *Kochsalzgruppe*. 18 Ratten (170—210 g) bekamen auf die gleiche Weise 5%ige NaCl-Lösung, 3% vom Körpergewicht.

4. *Wasser-(Kontroll)gruppe*. 17 Ratten (185—215 g), die nur Wasser, 3% vom Körpergewicht, in den Magen bekamen.

5. *Insulin-Äthanolgruppe*. 12 Ratten (170—220 g) bekamen 3 g/kg Äthanol in den Magen und 10 Einh./kg Insulin intramuskulär.

6. *Insulin-Wassergruppe*. 11 Ratten (170—220 g) erhielten Insulin und Wasser wie oben.

7. *Kochsalz-Wasser(Kontroll)gruppe*. 15 Ratten (170—240 g) bekamen Wasser in den Magen, 3% vom Körpergewicht, und 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung subcutan.

Nach 7 Tagen wurden die Ratten wieder gewogen und die Mengen der verfütterten und injizierten Stoffe, wenn nötig, dem Körpergewicht entsprechend korrigiert. Am 3., 7. und 14. Tage, 2 Std nach der Verabreichung, wurden von den Ratten, die Äthanol bekommen hatten, Blutproben für die Bestimmung der Blutalkoholkonzentration (BAK) entnommen. Am Schluß des Versuchs, 2 Std nach der letzten Verabreichung, wurden die Tiere gewogen, decapitiert und Blutproben genommen. An diesen wurden die BAK, die Hämatokrite, die Plasmanatrium-, Plasmakalium- und Plasmachloridwerte gemessen.

Die Nebennieren wurden in 10% neutralem Formalin fixiert und danach gewogen. Die eine Drüse wurde in Paraffin eingebettet, und die 7 $\mu$  dicken Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (H-E) gefärbt. Von der anderen Drüse wurden Gefrierschnitte gemacht und diese für den Nachweis der Lipide mit Fettrot und Sudanschwarz B gefärbt. Auch wurden Nativschnitte für polarisationsmikroskopische Untersuchungen angefertigt. Der Menge der Lipide in den Zonen der Nebennierenrinde wurde aufgrund der Farbintensität und der Menge der angefärbten Granulae arbiträr von eins bis fünf abgeschätzt. An den HE-Präparaten wurden die Vacuolen im Cytoplasma und die Größe der Zellkerne beachtet, und die Dicke der Zona glomerulosa mit einem Ocularmikrometer gemessen.

### Resultate

Die Gewichte der Tiere nahmen in allen Gruppen durchschnittlich 10 g im Lauf von 14 Tagen zu.

In der Äthanol- und Insulin-Äthanolgruppe betrugen die BAK-Werte etwa 1,0%<sub>oo</sub>, aber in der Äthanol-Kochsalzgruppe nur etwa die Hälfte davon (Tabelle 1).

Die Plasmaelektrolyten wichen von den Kontrollen signifikant nur in den beiden Insulingruppen ab. Es kamen leichte Hypokaliämie, deutliche Hypernatriämie und Hyperchlorämie, aber keine Veränderungen

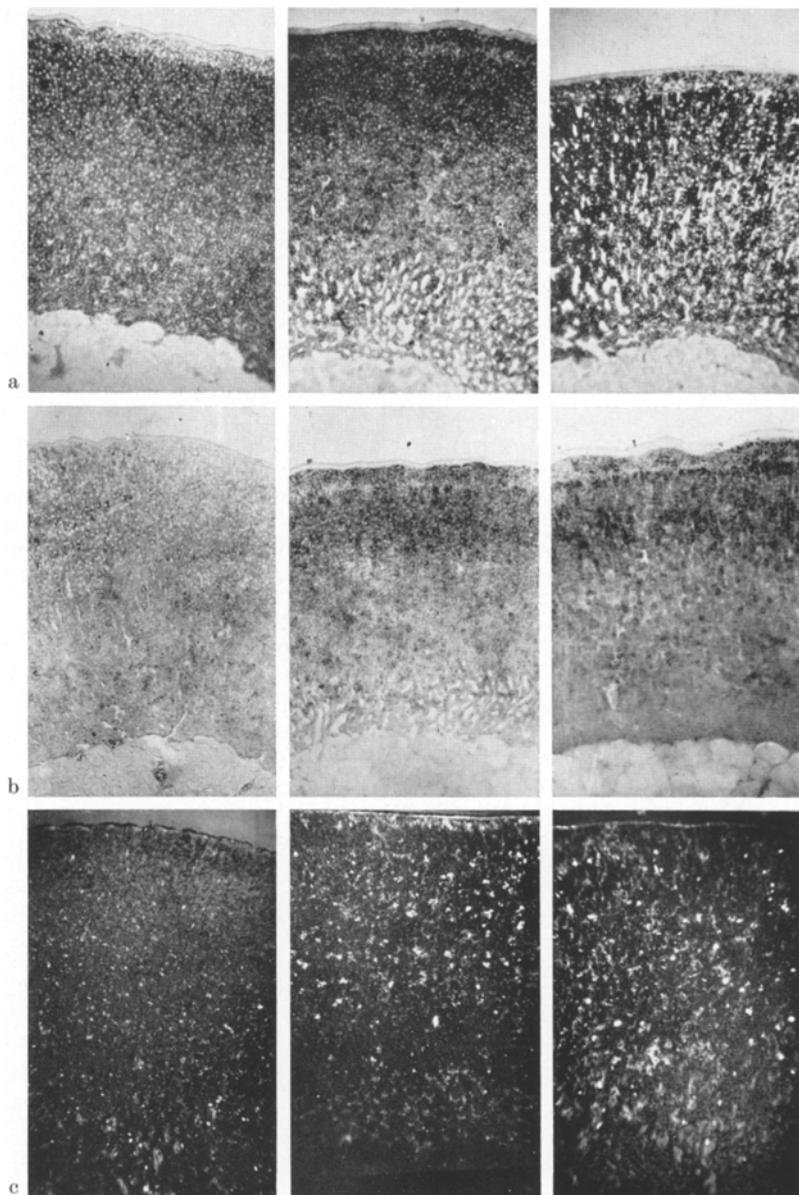


Abb. 1a—c

Abb. 2a—c

Abb. 3a—c

Abb. 1—3. Nebennierenrinde von drei Gruppen. a Sudan schwarz, b Fett rot, c polarisiertes Licht

Abb. 1a—c. Die Kochsalzgruppe. Sehr wenig Lipide in der Zona glomerulosa

Abb. 2a—c. Die Äthanolgruppe. Große Lipidmenge in der Z. glomerulosa, die auch

dick ist

Abb. 3a—c. Die Insulin-Äthanolgruppe. Sehr viel Lipide in der Z. fasciculata. Die Z. glomerulosa ist ziemlich leer. Vergr. 175×

Tabelle 1. Die Blutalkoholwerte 2 Std nach der Verabreichung. Mittelwerte und Grenzwerte in Promille

Gruppe	3. Tag	7. Tag	14. Tag
Äthanol	1,03 (0,52—1,60)	1,02 (0,63—1,35)	1,02 (0,66—1,66)
Äthanol—Salz	0,46 (0,02—1,09)	0,34 (0,03—0,90)	0,60 (0,23—1,46)
Insulin—Äthanol	1,07 (0,79—1,27)	1,06 (0,45—1,73)	0,78 (0,48—1,13)

Tabelle 2

Gewichte der Nebennieren und Menge der Lipide in arbiträren Einheiten von 1—5

Gruppe	Gewicht (mg) MW $\pm$ SD	Z. glomerulosa		Z. fasciculata			
		Sudan- schwarz	Fettrot	äußere		innere	
				Sudan- schwarz	Fettrot	Sudan- schwarz	Fett- rot
Äthanol	34,8 $\pm$ 3,6	3,5	2,8	4,4	3,0	3,2	2,2
Äthanol—Salz	31,1 $\pm$ 4,4	3,6	2,2	4,5	2,7	3,4	1,5
Salz	32,7 $\pm$ 3,4	3,0	1,9	4,6	2,7	3,4	1,7
Wasser (Kontrolle)	29,6 $\pm$ 4,9	3,6	2,8	4,1	2,4	3,0	1,6
Insulin— Äthanol	44,6 $\pm$ 6,7	3,1	2,3	4,4	3,0	3,2	1,6
Insulin— Wasser	40,9 $\pm$ 5,5	3,3	3,0	4,7	4,0	3,5	2,6
Salz—Wasser (Kontrolle)	36,1 $\pm$ 3,4	3,3	2,8	4,7	3,8	3,4	2,4

in den Hämokritwerten vor. Das Gewicht der Nebennieren stieg, mit den Kontrollen verglichen, in allen Testgruppen signifikant an ( $P < 0,01$ ). Die Zunahme war am größten in den Insulingruppen, nämlich etwa 15% (Tabelle 2). Die Lipide der Zona glomerulosa, nicht aber der Zona fasciculata, nahmen in der Kochsalzgruppe ab, was sowohl mit Fettrot als auch mit Sudanschwarz B nachgewiesen werden konnte. In den Äthanol- und den Äthanol-Kochsalzgruppen waren die Lipidmengen wie in den Kontrollen. In der Insulin-Äthanolgruppe zeigte der Lipidgehalt der beiden Zonen sowohl im Vergleich zu der Kontrolle als zur Insulin-Wassergruppe leicht abnehmende Tendenz (Tabelle 2). Im polarisierten Licht waren in der Zona glomerulosa in der Insulin-Wassergruppe spärlich große, doppelbrechende Kristalle zu sehen, desgleichen in der Kochsalzgruppe sowohl der Zona glomerulosa wie auch der Zona fasciculata. Der feinkörnige Schimmer war kräftig in der Zona glomerulosa der Äthanolgruppe sowie in der Zona fasciculata der Insulin-Wassergruppe.

Die Zona glomerulosa war etwas dicker in der Äthanolgruppe und Äthanol-Kochsalzgruppe als in der Kochsalzgruppe, entsprechend  $0,055 \pm 0,008$  mm und  $0,048 \pm 0,009$  mm (Mittelwert und Standard-deviation). Der Unterschied war jedoch nur beinahe signifikant ( $P < 0,05$ ). In der Wassergruppe war die Zona glomerulosa sehr dick,  $0,060 \pm 0,009$  mm, aber in der anderen Kontrollgruppe nur  $0,048 \pm 0,003$  mm. Die Zellkerne waren groß, rundlich und vacuolisiert, und ihre Nucleolen waren in den Äthanol-, Äthanol-Kochsalz- und Wassergruppen sehr deutlich sichtbar. In den anderen Gruppen waren die Kerne kleiner, dunkler und oval. Die Zellkerne der Zona fasciculata waren in den Äthanol-, Äthanol-Kochsalz-, Insulin-Äthanol- und Insulin-Wassergruppen groß und hell und hatten einen großen Nucleolus.

### Besprechung

Die Resultate zeigen, daß Äthanol die Nebennierenrinde der Ratte bei längerer Verabreichung aktiviert. Besonders in der Zona glomerulosa waren Zeichen von Hyperfunktion zu sehen, wie eine ziemlich große Lipidmenge, viel feinkörniger Schimmer im polarisierten Licht, große und vacuolisierte Zellkerne und Hypertrophie. Diese Wirkung wird noch deutlicher, wenn man sie mit der von der hypertonischen Natriumchloridlösung hervorgerufenen funktionellen Involution und mit der Hypertrophie in der Gruppe vergleicht, die gleichzeitig Äthanol und Natriumchlorid bekommen hatte. In der letztgenannten Gruppe war die Zona glomerulosa hypertrophiert, obgleich die hypertonische Kochsalzlösung Resorption des Äthanol verhindert hatte, und die BAK-Werte in der Äthanol-Kochsalzgruppe war 2 Std nach der Ingestion halb so hoch wie in allen anderen Gruppen. Unsere Befunde stützen zum Teil diejenigen von HION-JON beim Kaninchen und diejenigen von AUBERTIN beim Meerschweinchen. Die von HION-JON beschriebenen degenerativen Zeichen haben wir nicht feststellen können. Wahrscheinlich verursacht der hyperkaliämische und hyponatriämische Zustand, der nach der Verabreichung von Äthanol aufkommt (RUBINI et al.), die Hypertrophie der Zona glomerulosa (BLAIR-WEST et al.). Auch die Zona fasciculata wurde vom Äthanol aktiviert: die Gewichte der Nebennieren waren erhöht, die Zellkerne groß und die Lipide reichlich. Dies stimmt gut mit den Resultaten der akuten Experimente überein, in denen das Äthanol die Ausscheidung der Glucocorticoide vermehrte (ELLIS) und den Ascorbinsäuregehalt verminderte (FORBES et DUNCAN), sowie ferner auch mit dem Befund, daß Äthanol leichte Hypoglykämie hervorruft (FORSANDER et al.). Erstaunlich war in der Wassergruppe die Hypertrophie der Zona glomerulosa, die in der Kochsalz-Wassergruppe (in der anderen Kontrolle) wiederum nicht zu sehen war. Die Ursache dieses Unterschieds ist unklar.

In der Insulin-Wassergruppe und in der Kochsalz-Wassergruppe wies die Zona glomerulosa keinen Unterschied auf. Wenn das Insulin allein gegeben wurde, hatte es also keinen histologisch nachweisbaren Effekt auf die Zona glomerulosa. Wurden dagegen Insulin und Äthanol gleichzeitig verabreicht, so war die Zona glomerulosa in inaktivem Zustand. Die Ursache für dieses Phänomens liegt vielleicht darin, daß die Wirkungen dieser Stoffe auf die Flüssigkeits- und Elektrolytenbalance einander die Waage halten, so daß die Äthanolhyperkaliämie und die Insulinhypokaliämie einander ausgleichen. Das Insulin vermehrte auch die Aktivität der Zona fasciculata, aus den großen Zellkernen und Gewichten der Drüsen zu schließen. Der gleiche Vorgang war noch deutlicher in der Insulin-Äthanolgruppe zu sehen, wahrscheinlich wegen des „hypoglykämischen Synergismus“ dieser Stoffe.

### Zusammenfassung

Eine mäßige Äthanolmenge (3 g/kg Körpergewicht zweimal täglich) verursachte Hypertrophie und einen aktiven funktionellen Zustand in der Zona glomerulosa der Rattennebennierenrinde. Dieser Stimulus konnte den inaktivierenden Effekt hypertoner (5%) Natriumchloridlösung aufheben. Die Hypertrophie der Zona glomerulosa blieb aus, wenn Insulin (10 Einh./kg Körpergewicht zweimal täglich) und Äthanol zusammen gegeben wurden. Äthanol aktivierte auch die Zona fasciculata, und besonders starke Hypertrophie dieser Zone war nach kombinierter Behandlung mit Insulin und Äthanol zu sehen. Die Äthanolhypertrophie der Zona glomerulosa beruht wahrscheinlich auf der Hyperkaliämie und Hyponatriämie, die durch die Äthanolverabreichung verursacht sind. Die Ursache für die Aktivierung der Zona fasciculata nach Insulin-Äthanolbehandlung liegt möglicherweise in dem „hypoglykämischen Synergismus“ dieser Stoffe.

### Summary

Two weeks' ingestion of ethanol (3 g/kg, twice daily) caused hypertrophy of zona glomerulosa and activated its cells in the rat. Similar but weaker activation was seen in zona fasciculata. Ethanol could subside the involution of zona glomerulosa caused by hypertonic saline. Hypertrophy of zona glomerulosa was not seen, when insulin (10 I.U./kg, twice daily) was given with ethanol. Zona fasciculata, however, reacted very strongly to this treatment with hypertrophy. The effect of ethanol on zona glomerulosa is probably based on its tendency to produce hyperpotassemia and to lower the plasma sodium concentration and the combined effect of insulin and ethanol on their „hypoglycemic synergism“.

### Literatur

- AUBERTIN, CH.: Hyperplasie surrénale dans l'alcoolisme chronique expérimental. C.R. Soc. Biol. (Paris) **63**, 270 (1907).
- BACCHUS, H.: Cytochemical study of the adrenal cortex of the rat under salt stresses. Amer. J. Physiol. **163**, 326 (1950).
- BLAIR-WEST, J. R., J. P. COGHLAN, D. A. DENTON, J. R. GODING, M. WINTOUR, and R. D. WRIGHT: The control of aldosterone secretion. Recent Progr. Hormone Res. **19**, 311 (1963).
- ELLIS, F. W.: Adrenal cortical function in experimental alcoholism in dogs. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **120**, 740 (1965).
- FORBES, J. C., and G. M. DUNCAN: The effect of acute alcohol intoxication on the adrenal glands of rats and guinea pigs. Quart. J. Stud. Alcohol **12**, 355 (1951).
- FORSANDER, O., K. O. VARTIA u. F.-E. KRUSIUS: Experimentelle Studien über die biologische Wirkung von Alkohol. 1. Alkohol und Blutzucker. Ann. Med. exp. Fenn. **36**, 416 (1958).
- HIO-JON, V.: The influence of alcohol on the endocrine glands. Folia neuropath. eston. **3—4**, 288 (1925).
- KALANT, H., and C. CZAJA: The effect of repeated alcoholic intoxication on adrenal ascorbic acid and cholesterol in the rat. Canad. J. Biochem. **40**, 975 (1962).
- KRUSIUS, F.-E., K. O. VARTIA u. O. FORSANDER: Experimentelle Studien über die biologische Wirkung von Alkohol. 2. Alkohol und Nebennierenrinde-Funktion. Ann. Med. exp. Fenn. **36**, 424 (1958).
- RUBINI, M. E., C. R. KLEEMAN, and E. LAMPDEN: Studies on alcohol diuresis. I. The effect of ethyl alcohol ingestion on water and electrolyte and acid base metabolism. J. clin. Invest. **34**, 439 (1955).
- SMITH, J. J.: The effect of alcohol on the adrenal ascorbic acid and cholesterol of the rat. J. clin. Endocr. **11**, 792 (1951).

Dr. JORMA HIRVONEN  
Oikeusläketieteen laitos  
Helsinki 17, Snellmaninkatu 10