ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. XXXIX, 39 SECTIO D 1984

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Józef Staszyc

Elżbieta Anna JĘDRZEJEWSKA

Badania morfochemiczne i statystyczne kory nadnerczy szczurów białych, znajdujących się pod wpływem przewlekłej intoksykacji alkoholowej. II. Badania histotopochemiczne

Морфохимические и статистические исследования коры надпочечников белых крыс, находящихся под влиянием хронической алкогольной интоксикации. II. Гистотопохимические исследования

Morphochemical and Statistical Examinations of Adrenal Cortex in Rats under the Effect of Long-lasting Alcohol Intoxication. II. Histotopochemical Examinations

WSTĘP

Znane są zmiany histoformatywne kory nadnerczy osobników znajdujących się pod wpływem przewlekłego działania alkoholu etylowego (6, 7, 4).

W niniejszej pracy natomiast prześledzono zachowanie się tłuszczów, cholesterolu, α-ketoli, dehydrogenazy hydroksysterydowej i alkoholowej w nadnerczach szczurów, którym podawano etanol przez 12 tygodni. Ponieważ w chwili obecnej nie wyjaśniono do końca, czy proces utleniania alkoholu etylowego występuje również w nadnerczach, dlatego sprawdzono obecność dehydrogenazy alkoholowej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na 180 samcach szczurów białych rasy Wistar, hodowli wsobnej, w wieku 5—8 mies. Alkohol etylowy 40% podawano sondą dożołądkowo, codziennie, w dawce obliczonej indywidualnie i stanowiącej połowę dawki letalnej

dla szczura białego, która wynosi 13 660 mg/kg. Zwierzęta badano w 3 grupach czasowych:

Grupa I doświadczalna — zwierzęta, które otrzymywały etanol przez okres 1 tygodnia;

Grupa II doświadczalna — zwierzęta, które otrzymywały etanol przez okres 5 tygodni;

Grupa III doświadczalna — zwierzęta, które otrzymywały alkohol przez okres 12 tygodni.

Każda z grup posiadała kontrolę — zwierzętom podawano sondą dożołądkowo wodę do picia w tej samej ilości, a także kontrolę, w której zwierzęta nie otrzymywały nic. Ponieważ nie zaobserwowano różnicy pomiędzy kontrolami, przyjęto określać je jako jedną grupę kontrolną.

Wykonano ilościowe oznaczenie cholesterolu całkowitego metodą kolorymetryczną wg Chiamoriego (8). Rozmieszczenie cholesterolu i jego estrów w korze nadnerczy oceniono metodą histochemiczną wg Schultza (10). Zawartość tłuszczu w korze nadnerczy badano Sudanem III (10). Ocenę zawartości kortykoidów przeprowadzono metodą Khanolkhara w modyfikacji B. Penar (10). Główny enzym sterydogenezy — dehydrogenazę β-hydroksysterydową (1.1.1.51) wykonywano stosując jako substrat dehydroepiandosteron (10). Dehydrogenazę alkoholową wykrywano stosując jako substrat 1 M alkohol, wg metody przyjętej za Godlewskim (10).

BADANIA HISTOCHEMICZNE I BIOCHEMICZNE

ZAWARTOŚĆ TŁUSZCZÓW W KORZE NADNERCZY

Grupa kontrolna

Barwienie Sudanem wykazało, że warstwa kłębkowata kory nadnercza zawierała dużą ilość materiału sudanofilnego, tylko tuż pod torebką gruczołu w cytoplazmie komórek występowały drobne kropelki tłuszczowe, natomiast pozostałe komórki przepełnione były materiałem sudanofilnym (ryc. 1).

Wyraźnie wydzielona warstwa sudanofobna, zawierająca śladowe ilości materiału sudanofilnego, oddzielała warstwę pasmowatą, gdzie komórki ułożone promieniście obładowane były materiałem sudanofilnym.

Grupy I, II, III doświadczalne

W porównaniu ze wzorcem kontrolnym po 1 tygodniu doświadczenia warstwa kłębkowata zawierała podobną ilość kropli tłuszczowych, warstwa sudanofobna nie uległa zanikowi.

Podawanie alkoholu przez okres 5 tygodni spowodowało już wyraźne zmniejszenie się ilości tłuszczów w korze nadnerczy we wszystkich warstwach. Część sudanofobna kory nadnerczy nie u wszystkich zwierząt

była wyraźnie widoczna. W warstwie pasmowatej bardzo istotne było występowanie skupisk komórek pozbawionych materiału sudanofilnego. Taka ogniskowa delipolizacja występowała u większości badanych zwierząt (ryc. 2).

Po 12 tygodniach eksperymentu jedynie w pobliżu torebki znajdowały się komórki bogate w tłuszcze. Pozostałe komórki, w znacznie mniejszym stopniu wypełnione materiałem sudanofilnym, zatraciły swój wzorcowy układ, polegający na rozmieszczeniu pasmami komórek w różnym stopniu zawierających materiał sudanofilny.

ILOŚĆ CHOLESTEROLU W KORZE NADNERCZA

Ilość cholesterolu w nadnerczu, badana metodami biochemicznymi, w czasie trwania całego doświadczenia uległa istotnym zmianom. Dane, zestawione w tab. 1, wskazują, że ilość cholesterolu w 1 mg nadnercza szczura kontrolnego wzrosła w czasie 12 tygodni z 0,176 ±0,21 mmol/l do 0,423 ±0,056 mmol/l.

Podawanie alkoholu we wszystkich grupach wpływało na istotne zmniejszenie się ($p<0,001$) średniej ilości cholesterolu całkowitego w 1 mg nadnercza w porównaniu z kontrolą każdej grupy. Alkohol już po

Tab. 1. Ilość cholesterolu całkowitego w nadnerczu szczurów po podawaniu alkoholu
Amount of total cholesterol in suprarenal gland of rats after alcohol administration

Badana cecha	Rodzaj grupy	Zakres wartości min.-maks.	Wartości średnie ± odchylenie standardowe /x ± S_{n-1}/	Porównanie z kontrolą		
				różnice średnich /$\bar{x}$ dośw. -$\bar{x}$ kontr./	wartości funkcji testowej t	uwagi o istotności
Ilość cholesterolu w całym nadnerczu w mmol/l	I	2,56 - 4,30	3,245 ±0,407	-0,959	6,077	+++
	Ia	3,85 - 4,56	4,204 ±0,213			
	II	2,09 - 4,99	3,525 ±0,674	-0,615	2,559	+
	IIa	3,05 - 5,17	4,140 ±0,606			
	III	5,82 -11,43	6,998 ±1,474	-3,632	6,364	+++
	IIIa	8,47 -13,75	10,630 ±1,660			
Ilość cholesterolu w mmol/l w 1 mg nadnercza	I	0,082-0,143	0,119 ±0,018	-0,057	8,103	+++
	Ia	0,139-0,208	0,176 ±0,021			
	II	0,066-0,168	0,131 ±0,021	-0,055	6,160	+++
	IIa	0,135-0,244	0,186 ±0,030			
	III	0,214-0,478	0,293 ±0,049	-0,130	6,738	+++
	IIIa	0,354-0,520	0,423 ±0,056			

Objaśnienia: — — brak istotnych różnic, + — różnice istotne przy $p=0,05$, ++ — różnice istotne przy $p=0,01$, +++ — różnice istotne przy $p=0,001$.

Explanation: — — lack of statistical differences, + — statistically significant differences at $p=0.05$, ++ — statistically significant differences at $p=0.01$, +++ — statistically significant differences at $p=0.001$.

1 tygodniu podawania wywoływał gwałtowny spadek ilości cholesterolu w 1 mg tkanki nadnercza (różnica wynosiła 0,057 mmol/l) i potęgował się, osiągając najniższy poziom w 12 tygodniu doświadczenia (różnica wynosiła 0,130 mmol/l).

ROZMIESZCZENIE CHOLESTEROLU W KORZE NADNERCZY

Grupa kontrolna

Cholesterol, wykrywany metodą Schultza, obecny był w całej korze nadnerczy i rozmieszczony podobnie jak tłuszcze (ryc. 3). Komórki warstwy kłębkowatej wykazywały reakcję na cholesterol, również strefa sudanofobna zawierała komórki z pozytywną reakcją.

Na całej szerokości warstwy pasmowatej występowała bardzo silna reakcja na cholesterol, zwłaszcza w jej odcinku zewnętrznym. W warstwie pasmowatej wewnętrznej oraz siatkowatej odczyn był słabszy.

Grupy I, II, III doświadczalne

Po tygodniowym eksperymencie kora nadnerczy wykazywała słabszą reakcję barwną. Znaczna różnica wystąpiła w pierwszym odcinku warstwy pasmowatej.

Reakcja na cholesterol w eksperymencie 5-tygodniowym była mniej intensywna niż w kontroli. Podobnie jak w eksperymencie 1-tygodniowym, odczyn występował w zewnętrznej części warstwy pasmowatej, natomiast w pozostałej części warstwy pasmowatej oraz w warstwie siatkowatej stwierdzono śladowe ilości barwnego produktu.

Materiał doświadczalny grupy III wykazał bardzo dużą różnicę w porównaniu z preparatami kontrolnymi. Cała kora nadnercza miała znacznie słabszą reakcję barwną (ryc. 4). Najsilniejszy odczyn występował w warstwie pasmowatej zewnętrznej, jednak był on słabszy niż w kontroli.

ZAWARTOŚĆ KETOSTERYDÓW W KORZE NADNERCZY

Grupa kontrolna

U zwierząt kontrolnych reakcja na ketosterydy występowała w całej korze nadnerczy, jednakże w komórkach warstwy zewnętrznej pasmowatej była najsilniejsza (ryc. 5). Warstwa siatkowata wykazywała w większości przypadków znacznie słabsze reakcje.

Grupy I, II, III doświadczalne

Po tygodniu trwania eksperymentu intensywność reakcji na α-ketole była wyraźnie silniejsza w warstwie pasmowatej. Odczyn w warstwie kłębkowatej i siatkowatej był zbliżony do kontroli.

W grupie II doświadczalnej reakcja na ketosterydy była zbliżona do grupy I, jednak zachodziła słabsza reakcja w komórkach warstwy kłębkowatej.

W grupie III doświadczalnej komórki warstwy pasmowatej wykazywały silny odczyn dodatni na ketosterydy (ryc. 6). Niewidoczny był układ pasmowaty komórek, natomiast warstwa komórek pod torebką nie zawierała ketosterydów.

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY β-HYDROKSYSTERYDOWEJ (1.1.1.51)

Grupa kontrolna

U zwierząt kontrolnych dehydrogenaza β-hydroksysterydowa wykrywana była we wszystkich warstwach w jednakowym mniej więcej stopniu intensywności. We wszystkich komórkach obserwowano drobne ziarna formazanu, tylko w zewnętrznej części warstwy pasmowatej ziarna formazanu były większe i położone centralnie (ryc. 7).

Grupy I, II, III doświadczalne

Po tygodniu doświadczenia aktywność dehydrogenazy β-hydroksysterydowej wzrosła, aczkolwiek była to różnica niewielka.

Intensywność reakcji w grupie II doświadczalnej wzrosła, zwłaszcza w warstwie pasmowatej, w porównaniu z kontrolą (ryc. 8). Obok drobnych ziarenek formazanu występowały duże jego konglomeraty. Pojawił się również odczyn dyfuzyjny.

Intensywność reakcji po 12 tygodniach doświadczenia w pewnych odcinkach była niższa w porównaniu z poprzednimi grupami doświadczalnymi. Warstwa pasmowata przypominała kontrolę.

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY ALKOHOLOWEJ (1.1.1.1)

Grupa kontrolna

Dodatnia reakcja na dehydrogenazę alkoholową obecna była we wszystkich warstwach kory nadnerczy i występowała w równym stopniu nasilenia (ryc. 9). Barwny efekt reakcji był bardzo delikatny i jednakowy we wszystkich warstwach.

Grupy I, II, III doświadczalne

W porównaniu z kontrolą, barwny efekt reakcji na dehydrogenazę alkoholową w korze nadnerczy po 1 i 5 tygodniach podawania alkoholu był silniejszy. Intensywny odczyn zaznaczył się zwłaszcza w pierwszych odcinkach kory nadnerczy (ryc. 10).

Natomiast w grupie III doświadczalnej reakcja uwidoczniająca dehydrogenazę alkoholową była mniej intensywna w porównaniu z poprzednimi grupami, ale zbliżona do kontroli.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Większość autorów, między innymi Forbes i Duncan (4), zwłaszcza w badaniach klinicznych, zwraca uwagę na upośledzenie u alkoholików czynności kory nadnerczy. W tej pracy stwierdzono znaczne zaburzenia funkcji kory nadnerczy. Należy sądzić, że częściowe zmiany spowodowane były bezpośrednim wpływem etanolu na korę nadnerczy, obserwowana bowiem obecność i wzrost aktywności dehydrogenazy alkoholowej może świadczyć o pewnym udziale tego gruczołu w procesie utleniania alkoholu.

Ciekawą zależność zaobserwował Sze (15) wskazując, że aktywność enzymu wymaga obecności glikokortykosterydów i łączy się to z działaniem „przyzwalającym" kortykosterydów. Skutkiem utleniania etanolu dochodzi do zwiększonego wytwarzania cholesterolu, tłuszczów we krwi i w wątrobie (1, 14, 10, 9). W odwrotnej proporcji do zawartości tłuszczów we krwi znajdował się ich ślad w korze nadnerczy. Zarówno ilość cholesterolu wykazywana metodami biochemicznymi, jak i tłuszcze oraz cholesterol wykazywane metodami histochemicznymi wskazywały na zmniejszenie się ich ilości wraz z czasem trwania doświadczenia. Efekt obniżenia ilości tłuszczów i cholesterolu jest cechą obserwowaną przy pobudzaniu gruczołu przez ACTH (12, 3, 16).

Z pobudzoną aktywnością gruczołu korelowałaby wzmożona aktywność dehydrogenazy β-hydroksysterydowej, która jest istotnym ogniwem syntezy sterydów.

Obserwowano również wzrost ilości α-ketosterydów. Podobną zależność stwierdzał Rhodin (13) po działaniu ACTH — gwałtowne obniżenie ilości kropli tłuszczowych w warstwie pasmowatej korelowało z większą ilością kortykoidów.

Większość badań, między innymi Jenkinsa i wsp. oraz Connolly'ego (5, 2), wskazuje, że etanol wpływa na ten etap sterydogenezy poprzez ACTH. Przerost błon gładkiej siatki śródplazmatycznej (7),

na której poziomie znajdują się enzymy procesu syntezy hormonów sterydowych, tłumaczy wzrost aktywności dehydrogenazy — zwiększoną dzięki temu produkcją α-ketosterydów.

Istotne jest to, że zmiany metabolizmu spowodowane były pośrednio oraz bezpośrednio poprzez częściowe utlenianie etanolu w nadnerczach przez dehydrogenazę alkoholową. Należy stwierdzić, że po 12 tygodniach podawania etanolu dochodzi do znacznego zaburzenia funkcji nadnerczy związanej ze zmniejszeniem się ilości lipidów oraz cholesterolu w ich korze, połączone z wystąpieniem ogniskowej delipolizacji oraz wzrostem ilości ketosterydów.

PIŚMIENNICTWO

1. Belfrage P. i wsp.: Prolonged Administration of Ethanol to Young Heatchy Volunters; Effects on Biochemical, Morfological and Neuro Physiological Parameters. Acta Med. Scand. Suppl. **552**, 1, 1973.
2. Deitrich R. A.: Biochemical Aspects of Alcoholism. Psychoneuroendocrin. **1**, 325, 1976.
3. Dobrzański T.: Heterogeneity of ACTH — Its Clinical Implications in Acute Alcohol with Drawal Syndromes. Endokryn. Pol. **29**, 407, 1978.
4. Forbes J. C., Duncan G. M.: The Effect of Acute Alcohol Intoxication in Adrenal Glands of Rat and Guinea-Pig. Quarterly J. of Stud. on Alc. **12**, 355, 1951.
5. Jenkins J. S., Connolly J.: Adrenocortical Response to Ethanol in Man. Br. Med. J. **2**, 804, 1968.
6. Jędrzejewska E. A.: Badania morfochemiczne i statystyczne kory nadnerczy szczurów białych znajdujących się pod wpływem przewlekłej intoksykacji alkoholowej. I. Badania morfochemiczne i statystyczne. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sectio D **39**, 1984.
7. Jędrzejewska E. A.: Die Zytostruktur der *Zona glomerulosa* und *fasciculata* der Nebennierenrinde bei der langwierig mit Äthanol getränkten weissen Ratte. Zeitschr. für Zellfor. (w druku).
8. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice. PZWL, Warszawa 1969.
9. Krebs H., Perkins I. R.: The Physiological Role of Alcohol Dehydrogenase. Biochem. J. **118**, 635, 1970.
10. Krygier-Stojałowska A., Godlewski G. H.: Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN, Warszawa 1975.
11. Lieber C. S.: Liever Adaptation and Injury in Alcoholism. N. Engl. J. Med. **288**, 356, 1973.
12. Malendowicz L. K., Fichna P.: Wpływ ACTH na aktywność desmolazy cholesterolu w korze nadnerczy szczura oceniony na podstawie przekształcenia endogennego cholesterolu w pregnenolon. Endokryn. Pol. **27**, 585, 1976.
13. Rhodin G. A.: The Ultrastructure of the Adrenal Cortex of the Rat Under Normal Experimental Conditions. Journal Ultrastruc. Res. **34**, 23, 1971.

14. Svendsen T. L., Hartling O., Trap-Jensen J.: Effect of Adrenergic β-receptor Blocade on Ethanol. Elimination and on Ethanol Induced Changes in Carbohydrate and Lipid Metabolism in Man. Eur. J. Pharmacol. **13**, 91, 1978.
15. Sze P. Y.: The Permissive Effect of Glucocorticoids in the Induction of Liver Alcohol Dehydrogenase by Alcohol. Biochem. Med. **14**, 156, 1975.
16. Wilczyńska J.: Wpływ alkoholu na wydzielanie ACTH — obserwacje w chorobie Cushinga i pseudo-Cushinga. Endokryn. Pol. **31**, 449, 1980.

Otrzymano 15 III 1984.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Kora nadnercza, grupa kontrolna. Barwienie Sudanem III. Pow. ok. 300×.

Ryc. 2. Kora nadnercza, grupa II doświadczalna. Barwienie Sudanem III. Pow. ok. 200×.

Ryc. 3. Kora nadnercza, grupa kontrolna. Barwienie wg metody Schultza. Pow. ok. 200×.

Ryc. 4. Kora nadnercza, grupa III doświadczalna. Barwienie wg metody Schultza. Pow. ok. 200×.

Ryc. 5. Kora nadnercza, grupa kontrolna. Reakcja Khanolkhara na ketosterydy. Pow. ok. 200×.

Ryc. 6. Kora nadnercza, grupa III doświadczalna. Reakcja Khanolkhara na ketosterydy. Pow. ok. 200×.

Ryc. 7. Kora nadnercza, grupa kontrolna. Odczyn na dehydrogenazę β-hydroksysterydową. Pow. ok. 150×.

Ryc. 8. Kora nadnercza, grupa II doświadczalna. Odczyn na dehydrogenazę β-hydroksysterydową. Pow. ok. 200×.

Ryc. 9. Kora nadnercza, grupa kontrolna. Odczyn na dehydrogenazę alkoholową. Pow. ok. 200×.

Ryc. 10. Kora nadnercza, grupa I doświadczalna. Odczyn na dehydrogenazę alkoholową. Pow. ok. 200×.

РЕЗЮМЕ

Исследования проведены на 180 самцах крыс штамма Вистар, которым зондом вводился 40% алкоголь в количестве половины смертельной дозы для данного штамма. Алкоголь вводился в течение 1, 5 и 12 недель. В надпочечниках определялось количество холестерина и его расположение, наличие жиров, кетостероидов и В-гидроксистероидного дегидрогенеза. Для проверки, происходит ли по крайней мере частичное окисление этанола в надпочечниках, проверено присутствие алкогольного дегидрогенеза. Констатировано увеличение активности алкогольного дегидрогенеза и тем самым непосредственное влияние этанола на кору надпочечников. Благодаря проведенным исследованиям можно заметить уменьшенное количество липидов и холестерина, а также увеличение количества кетостероидов и В-гидроксистероидного дегидрогенеза о возбужденной функции коры надпочечника.

SUMMARY

Examinations were performed on 180 male rats of Wistar strain which were given 40% ethanol by tube in the dose being half lethal dose for a white rat. Alcohol was being given for a period of 1, 5 and 12 weeks. In the suprarenal gland there was estimated the amount of cholesterol and its distribution, and the presence of fats, ketosteroids and 8-hydroxysteroid dehydrogenase. In order to find out whether there takes place at least partial ethanol oxidation in the suprarenal gland the presence of alcohol dehydrogenase has been checked. An increase of alcohol dehydrogenase activity which accounts for direct effect of ethanol on adrenal cortex was proved. Results of the examinations such as decreased amount of lipids and cholesterol and increased amount of ketosteroids and 8-hydroxysteroid dehydrogenase suggest the stimulated activity of adrenal cortex.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Adrenal cortex. Control group. Staining with (pigment brown). Sudan III. Magn. ca 300×.

Fig. 2. Adrenal cortex. II experimental group. Staining with Sudan LLL. Magn. ca 200×.

Fig. 3. Adrenal cortex. Control group. Staining according to Schultz's method. Magn. ca 200×.

Fig. 4. Adrenal cortex. III experimental group. Staining according to Schultz's method. Magn. ca 200×.

Fig. 5. Adrenal cortex. Control group. Khanolkhar's reaction to ketosteroids. Magn. ca 200×.

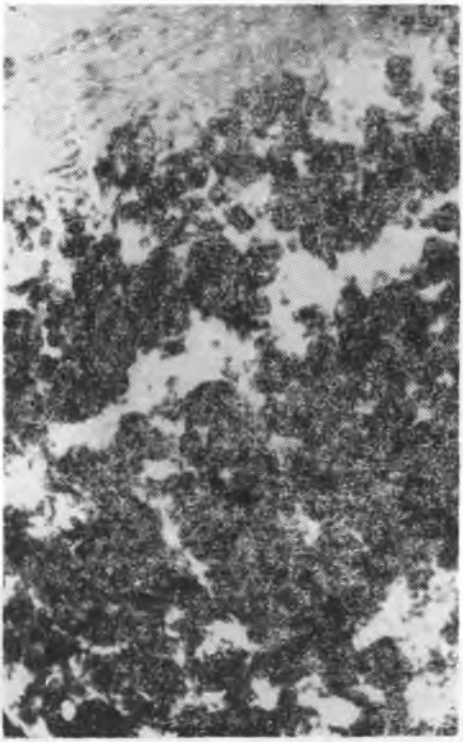
Fig .6. Adrenal cortex. II experimental group. Khanolkhar's reaction to ketosteroids. Magn. ca 200×.

Fig. 7. Adrenal cortex. Control group. Reaction to 8-hydroxysteroid dehydrogenase. Magn. ca 150×.

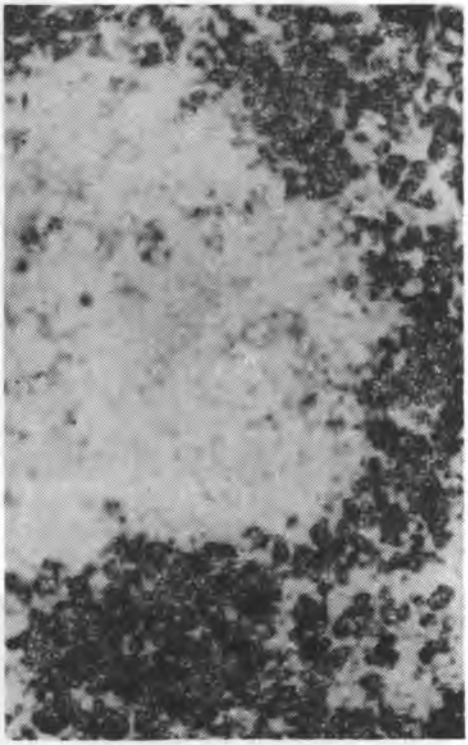
Fig. 8. Adrenal cortex. II experimental group. Reaction to 8-hydroxysteroid dehydrogenase. Magn. ca 200×.

Fig. 9. Adrenal cortex. Control group. Reaction to alcohol dehydrogenase. Magn. ca 200×.

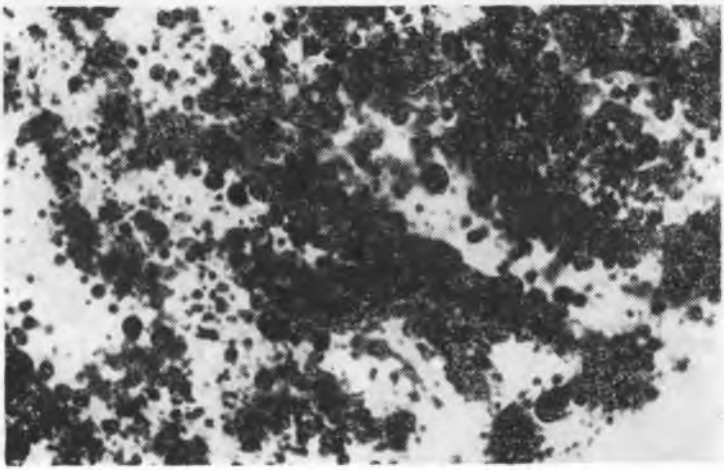
Fig. 10. Adrenal cortex. I experimental group. Reaction to alcohol dehydrogenase. Magn. ca 200×.



Ryc. 1

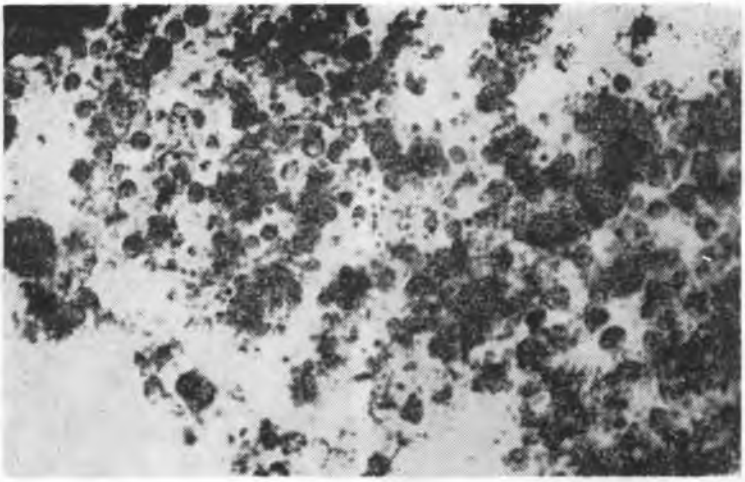


Ryc. 2

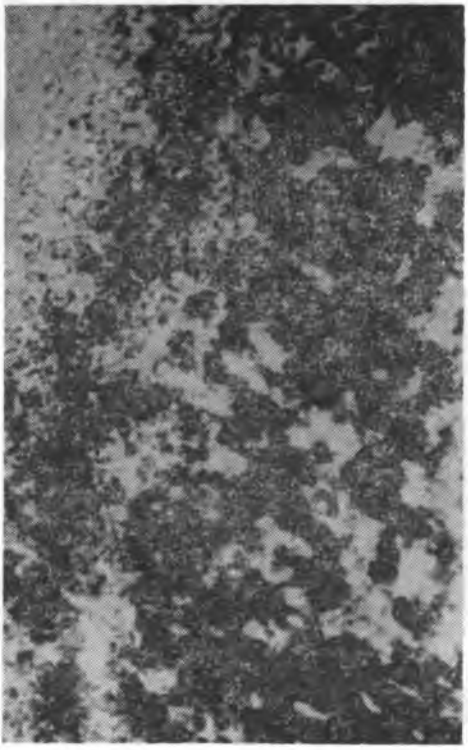


Ryc. 3

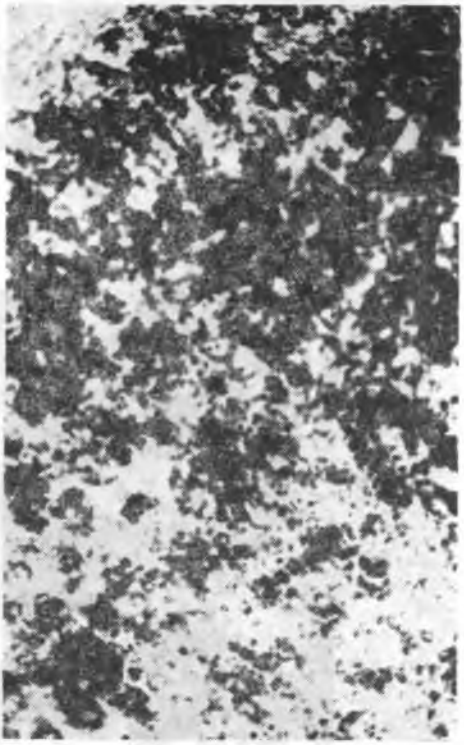
Elżbieta Anna Jędrzejewska



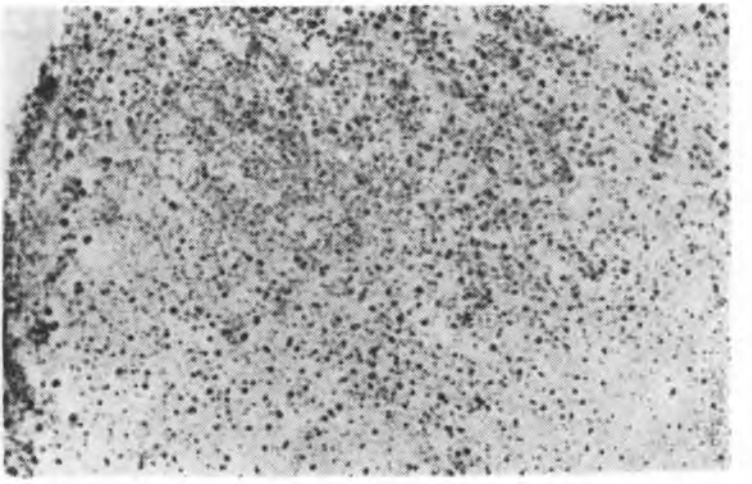
Ryc. 4



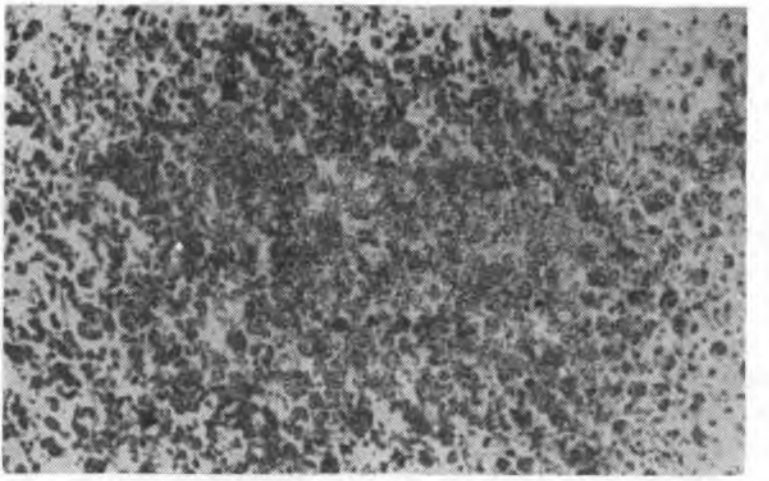
Ryc. 5



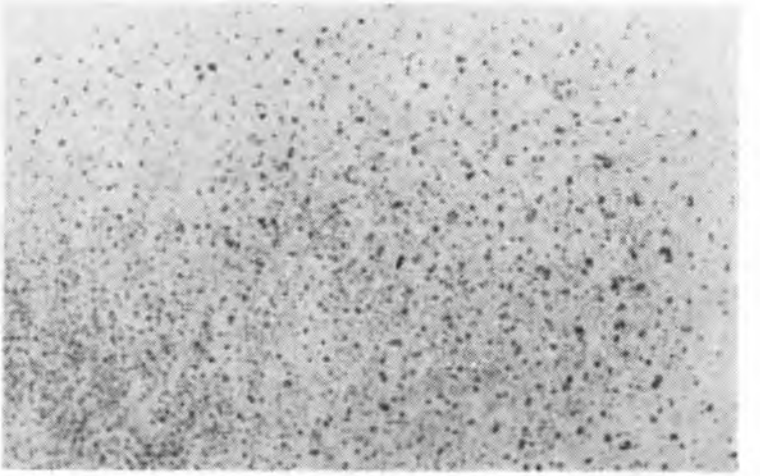
Ryc. 6



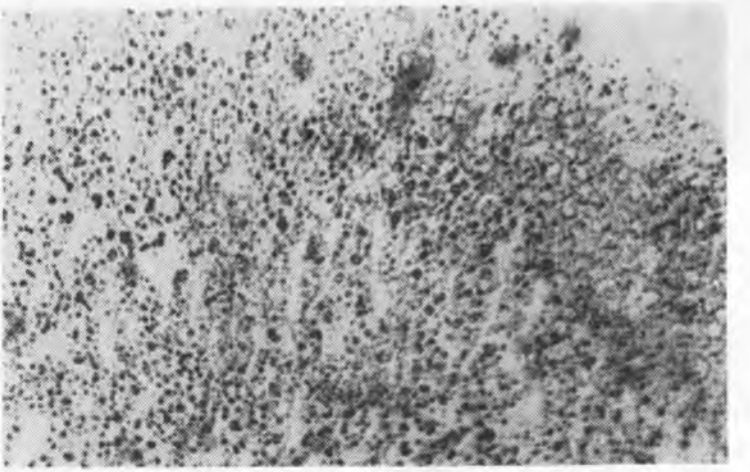
Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



Ryc. 10