

2. Material und Methoden

2.1. Vorbereitung der Aorten- bzw. Trachealringpräparationen

Die Experimente wurden an männlichen Lewis-1a-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 300 und 350 Gramm vorgenommen, die von der tierexperimentellen Abteilung Karlsburg geliefert wurden. Die Untersuchung wurde nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzkommission durchgeführt. Alle Tiere wurden in einzelnen Käfigen untergebracht und erhielten Wasser und Futter zur freien Verfügung.

Für die Experimente wurden die Ratten durch einen Schlag auf den Kopf betäubt, dann wurde die Aorta durchtrennt. Die Aorten/Tracheen wurden in Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung in Millimol [mM]: 113 NaCl, 4.8 KCl, 1.3 MgCl₂ x 6 H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 5.7 Glukose) getaucht und unter mikroskopischer Kontrolle vom umgebenden Gewebe befreit.

Anschließend wurden sie in gleich große Trachealringe (2 Knorpelspangen) oder Aortenringe (2-3 mm lang) zerteilt.

Tabelle 1. Versuchsgruppen mit Aorta der Ratte

Anzahl (n)	Vorbehandlung	Kontraktion
9	+Endothel	Phenylephrin 5 x 10 ⁻⁷ M
6	-Endothel	Phenylephrin 5 x 10 ⁻⁷ M
7	Präinkubation mit ODQ 10 ⁻⁴ M	Phenylephrin 5 x 10 ⁻⁷ M
5	Präinkubation mit SQ 10 ⁻⁵ M	Phenylephrin 5 x 10 ⁻⁷ M
6		KCl 40 mM
6		KCl 80 mM

Tabelle 2. Versuchsgruppen mit Trachea der Ratte

Anzahl (n)	Vorbehandlung	Kontraktion
6	+Epithel	Carbachol 10^{-5} M
6	-Epithel	Carbachol 10^{-5} M
9	Präinkubation mit ODQ 10^{-4} M	Carbachol 10^{-6} M
6	Präinkubation mit SQ 10^{-5} M	Carbachol 10^{-6} M
6		KCl 40 mM
6		KCl 80 mM
3	Behandlung mit Thapsigargin 10^{-5} M	Carbachol 10^{-6} M
5	Kontrolle	Carbachol 10^{-6} M

2.2. System

Um die Effekte von DHEA auf die Kontraktion der glatten Muskulatur zu untersuchen, wurden die Aorten- bzw. Trachealringpräparationen immer auf die gleiche Art und Weise zwischen zwei Metallhaken gespannt, wobei der untere befestigt war und als Fixpunkt diente.

Der obere Haken war an einen isometrischen Transducer (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg) angeschlossen, der mit einem Mikromanipulator verbunden war und eine Veränderung des Hakens entlang einer vertikalen Achse ermöglichte.

Die Änderung der Spannung am Aorten- bzw. Trachealmuskel wurde nach Potenzierung des Signals durch einen Verstärker (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg) von einem Multikanalschreiber (Rikadenki, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) registriert, mit dem der Transducer verbunden war.

Das System mit den beiden Metallhaken und den Ringpräparationen befand sich in einem doppelwandigen Organbad, welches innen mit Krebs-Henseleit-Lösung (25 ml) gefüllt war, die konstant bei einer Temperatur von 37 °C gehalten wurde. Unten im Organbad

mündete eine Zuleitung über die ständig Sauerstoff und Kohlendioxid (95 %/5 %) zugeführt wurden, die eine gute Oxygenierung und Verteilung der verwendeten Substanzen gewährleisteten (Abbildung 5).

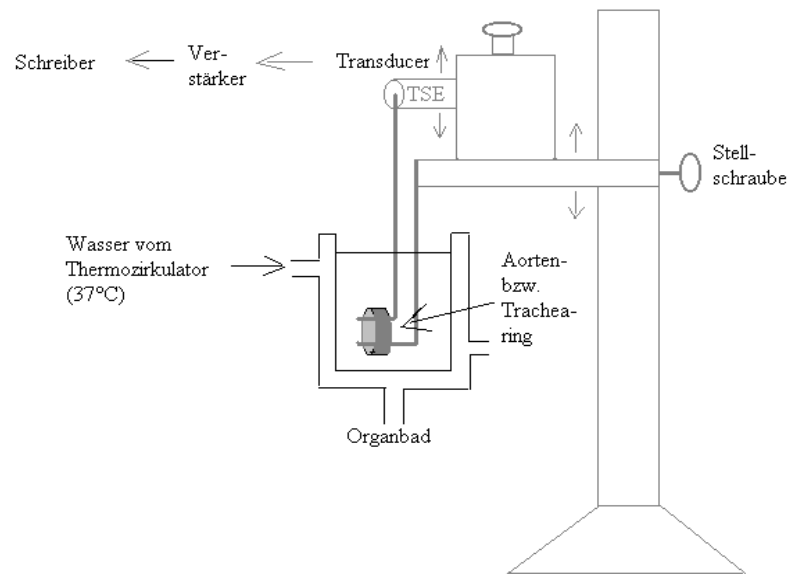


Abbildung 5. Skizze des Versuchsaufbaus

2.3. Ablauf

Nach einer Phase der Stabilisierung wurde der glatte Muskel stufenweise auf seine optimale Länge vorgespannt, welche in Vorversuchen etabliert wurde und einem Gegengewicht von ungefähr 1.5 Gramm entspricht. Diese Prozedur dauerte insgesamt ca. 90 Minuten.

Anschließend wurde an den Präparationen eine Testkontraktion mit Carbachol 10^{-6} M (Trachea) oder mit Phenylephrin 5×10^{-7} M (Aorta) durchgeführt, welches dann mit Krebs-Henseleit-Lösung ausgewaschen wurde. Auf diese Weise wurde die Intaktheit der Aorten- bzw. Trachealringpräparationen überprüft.

2.4. Versuchsgruppen mit Aorta der Ratte

2.4.1. Wirkung des Endothels auf die Relaxation durch DHEA an Aortenringen

In einer Hälfte der Präparationen wurde vor Versuchsbeginn das Endothel durch sanftes Reiben mit einem Wattestäbchen entfernt (-End), in der anderen Hälfte wurde das Endothel intakt gelassen (+End).

20 bis 30 Minuten nach der Testkontraktion wurden die Aortenringe erneut mit Phenylephrin 5×10^{-7} M kontrahiert. Wenn die Kontraktion ein Plateau erreichte, wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} bis 5×10^{-5} M) von DHEA verabreicht (Abbildung 6).

2.4.2. Effekte von cGMP-/cAMP-Blockern auf die Relaxation durch DHEA an Aortenringen

Nach der Testkontraktion wurde die eine Hälfte der Präparationen 30 Minuten mit ODQ 10^{-4} M (cGMP-Blocker) und die andere Hälfte mit SQ 22536 10^{-5} M (cAMP-Blocker) präinkubiert. Dann wurden die Aortenringe mit Phenylephrin 5×10^{-7} M kontrahiert. Wenn die Kontraktion ein Plateau erreichte, wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} M bis 5×10^{-5} M) von DHEA verabreicht (Abbildung 7).

2.4.3. Einfluss von Kaliumchlorid auf die Relaxation durch DHEA an Aortenringen

20 bis 30 Minuten nach der Testkontraktion wurde die eine Hälfte der Aortenringe mit Kaliumchlorid (KCl) 40 mM und die andere Hälfte mit KCl 80 mM kontrahiert. Wenn die Kontraktion ein Plateau erreichte, wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} M bis 5×10^{-5} M) von DHEA verabreicht (Abbildung 8).

2.5. Versuchsgruppen mit Trachea der Ratte

2.5.1. Wirkung des Epithels auf die Relaxation durch DHEA an Trachealringen

In einer Hälfte der Präparationen wurde vor Versuchsbeginn das Epithel mit einem Wattestäbchen entfernt (-EP), in der anderen Hälfte wurde das Epithel intakt gelassen (+EP).

20 bis 30 Minuten nach der Testkontraktion wurden die Trachealringe mit Carbachol 10^{-5} M kontrahiert. Wenn die Kontraktion ein Plateau erreichte, wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} bis 5×10^{-5} M) eingegeben (Abbildung 9).

2.5.2. Effekte von cGMP-/cAMP-Blockern auf die Relaxation durch DHEA an Trachealringen

Nach der Testkontraktion wurde die eine Hälfte der Präparationen 30 Minuten mit ODQ 10^{-4} M (cGMP-Blocker) und die andere Hälfte mit SQ 22536 10^{-5} M (cAMP-Blocker) präinkubiert. Dann wurden die Trachealringe mit Carbachol 10^{-6} M kontrahiert. Wenn die Kontraktion ein Plateau erreichte, wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} bis 5×10^{-5} M) von DHEA eingegeben (Abbildung 10).

2.5.3. Einfluss von Kaliumchlorid auf die Relaxation durch DHEA an Trachealringen

20 bis 30 Minuten nach der Testkontraktion wurde die eine Hälfte der Präparationen mit Kaliumchlorid (KCl) 40 mM und die andere Hälfte mit KCl 80 mM kontrahiert. Wenn die Kontraktion ein Plateau erreichte, wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} bis 5×10^{-5} M) von DHEA verabreicht (Abbildung 11).

2.5.4. Wirkung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum auf die Relaxation durch DHEA an Trachealringen

20 bis 30 Minuten nach der Testkontraktion wurden die Präparationen mit Carbachol 10^{-6} M kontrahiert. Die eine Hälfte der Trachealringe wurde dann mit Thapsigargin 10^{-5} M (Blocker der ATPase am sarkoplasmatischen Retikulum) behandelt, während die andere Hälfte so belassen wurde. Nach einer Phase der Stabilisierung (ca. 10 Minuten) wurden in einer Serie von Experimenten kumulative Konzentrationen (10^{-6} bis 5×10^{-5} M) von DHEA eingegeben (Abbildung 12).

2.6. Substanzen

Die folgenden Substanzen wurden verwendet:

DHEA (Dehydroepiandrosteron)

Jenapharm GmbH & Co KG, Jena

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Carbachol (Carbamylcholinchlorid)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Phenylephrin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3a]quinoxalin-1-on)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

SQ 22536 (9-[tetrahydro-2-furanyl]-9H-purin-6-amin)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Thapsigargin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

KCl (Kaliumchlorid)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Vitamin C (Ascorbinsäure)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Krebs-Henseleit-Lösung (hergestellt aus den entsprechenden Substanzen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim und destilliertem Wasser)

Die Anfangslösungen von DHEA (10^{-1} und 10^{-2} M) wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt, KCl mit Krebs-Henseleit-Lösung, alle anderen Lösungen mit destilliertem Wasser.

2.7. Analyse der Ergebnisse

Die Daten werden in Prozent von der maximalen Kontraktion und in Absolutwerten (Gramm und Sekunde) angegeben. Der Mittelwert und die Standardfehler wurden errechnet. Halb maximale Werte der Konzentration (EC_{50}) wurden mittels Regressionsanalyse von probit-transformed Daten bestimmt und die Ergebnisse werden als Mittelwert des negativen dekadischen Logarithmus von EC_{50} kalkuliert. Für die statistische Auswertung wurde die Varianzanalyse und der Student-t-Test für abhängige/paarige oder unabhängige Stichproben eingesetzt. Als statistisch signifikant wurde $P < 0.05$ erachtet.

Die Berechnung der EC_{50} -Werte erfolgte mit dem Programm Pharmacologic Calculation System (PHARM/PCS) Version 4.2 von Tallarida RJ und Murray RB von MicroComputer Specialists (Philadelphia, USA) basierend auf dem "Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programms" (Second Edition, 1987), während der Student-t-Test mit dem Programm Primer in Biostatistics Version 1.0 von Glantz SE von McGraw-Hill-Companies (Berkshire, UK) durchgeführt wurde.