

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Medien und Geräte

Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, mit der Qualitätsbezeichnung *pro analysi* bezogen. Ausnahmen sind das Desoxycorticosteronacetat – Pellet (Innovative Research, Tampa, Florida, USA) und der Histoacryl - Gewebekleber (Braun AG, Melsungen).

Medien

Für den Gewebetransport und die Aufbewahrung wurde eiskaltes Kulturmedium MEM mit Earle´s Salzen und 20 mM Hepes (Biochrom KG, Berlin) verwandt. Für die kurzfristige Aufbewahrung im Brutschrank kam Medium 199 (Biochrom KG, Berlin) zum Einsatz.

Geräte

Axiovert 135 (Zeiss, Deisenhofen)

Stereomikroskop Wild M3Z mit Kaltlichtquelle KL 1500 (Leica, Heerbrugg, Schweiz)

Patch-Clamp Mikromanipulator (Wolfgang Hampel, Neu Isenburg)

DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrumente, Augsburg)

Experimentierbad mit 2 Kanal Regelgerät für Bad- und Zulaufheizung
(Wolfgang Hampel, Neu Isenburg)

Schwingungsisolierter Tisch (Physik Instrumente, Waldborn)

HM 408 2-Kanal-Digitalspeicherscope (Velma, Großkrotzenburg)

EPC 9 computergesteuerter Patch-Clamp Verstärker mit 4 Pol Besselfilter für Atari Mega-ST4
(HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz)

Atari Mega-ST 4

Blutdruckmeßgerät HVD-50-006 (Zak GmbH, Simbach)

Standard Laborgeräte

2.2 Tiere

Männliche Sabra-Ratten wurden von Prof. Y. Yagil und C. Yagil, Barzilai Medical Center, Ashkelon, Ben Gurion University, Israel zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten, und es stand ihnen bis zum Beginn der Behandlung Standardnagerkost und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung und die Behandlung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien der lokalen Ethikkommission. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Tierversuche sind durch die Ethikkommission des UKBF und durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt worden (Tierversuch-Genehmigungsnummer: G 033997 vom 23.02.1998).

2.2.1 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte mittels Schwanzmanschetten-Sphygmomanometrie. Hierbei wurde am Ansatz des Rattenschwanzes der Blutfluß in der Schwanzarterie mit einer Manschette gestaut. Bei langsamer Lockerung des Manschettendrucks registrierte eine in der Manschette befindliche Photoelektrode den wieder beginnenden Blutfluß bei gleichzeitiger Manschetten-Druckregistrierung. Die Daten wurden Computer-gestützt aufgezeichnet und ausgewertet (TSE, Bad Homburg). Die einzelnen Tiere wurden gekennzeichnet, um eine Zuordnung der Blutdruckwertepaare zu ermöglichen.

2.3 Implantation des Desoxycorticosteronacetat-Pellets und Salzdiät

Den zu behandelnden, 4 Wochen alten, SBH/y und SBN/y wurde zur Implantation des Mineralokortikoid-Pellets unter Äther-Narkose im Bereich des Nackens ein Hautschnitt gesetzt und das Pellet (ca. 7 mm Durchmesser) unter das subkutane Fettgewebe implantiert. Es handelt sich dabei um ein 75 mg Desoxycorticosteronacetat – Pellet (DOCA). Die Wunde wurde vernäht und verheilte bei allen operierten Tieren gut. Nach der DOCA-Implantation wurde den Tieren 1%-iges NaCl *ad libitum* als Trinkwasser zur Verfügung gestellt und damit die Salzbelastung begonnen. Die Kombination von DOCA und Salz wird angewandt, um

die volle Ausprägung des Hypertonus bei den SBH/y zu beschleunigen. DOCA allein führt nicht zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks (Yagil und Yagil, 1998).

Die nicht salz-belasteten Tiere wurden im Alter von 4 Wochen Schein-operiert. Die Wundheilung verlief problemlos. Nach der Operation wurde den Tieren Wasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

2.4 Gefäßpräparation

Die Ratten wurden unter Äther-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Die thorakale Aorta wurde vorsichtig unter Vermeidung einer Überdehnung herauspräpariert und in eine eisgekühlte Ringerlösung überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden die Adventitia und Blutreste entfernt. Die thorakale Aorta wurde dann mit einer Mikrodissektionsschere längs aufgeschnitten. Für die Untersuchungen am intakten Endothel wurde eine Unterteilung in kleinere Segmente (3-4 mm²) vorgenommen.

Die Mesenterialarterie (Ast der Arteria mesenterica superior) wurde im Bereich zwischen dem 8. und 15. Seitenast mit einem Außendurchmesser von 150 bis 250 µm vorsichtig aus dem Mesenterium herausgetrennt. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend der Präparation der Aortensegmente.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Gefäßsegmente, ohne die Endothelzellschicht zu beschädigen, direkt ins Experimentierbad überführt und mit Histoacrylgewebekleber (Braun Melsungen AG) am Boden der Experimentierkammer fixiert, so daß die luminale Seite dem Bad zugewandt war und mit der Patchpipette erreicht werden konnte.

2.5 Patch-Clamp-Untersuchungen

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Sakmann und Neher entwickelt und ermöglicht die Charakterisierung von einzelnen Ionenkanälen in Zellmembranen (Neher und Sakmann, 1976; Hamill et. al., 1981). Die Bildung einer elektrisch dichten Verbindung zwischen einer haarfein ausgezogenen Glaskapillare und der Zellmembran erlaubt die elektrische Ausmessung des Membranareals unter der Kapillare mit einer Größe von weniger als 1 µm². Hierbei wird die Zellmembran von

der Glaskapillare, der sogenannten Patchpipette, angesaugt. Die dabei entstehenden hohen Adhäsionskräfte führen zu einer hohen elektrischen Abdichtung. Diese hochohmige Verbindung (3-10 G Ω), das so genannte *Seal*, ermöglicht die Auflösung von einzelnen Ionenkanalströmen. Mit Hilfe eines elektronischen Verstärkers wird das Membranpotential auf eine definierte Spannung geklemmt, und der hierbei fließende Strom wird registriert. Das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen, die sich in dem Membranfleck, im nachfolgenden *Patch* genannt, befinden, führt zu einer Änderung des Membranwiderstandes und damit, dem Ohm'schen Gesetz entsprechend, zu einer Änderung des gemessenen Stroms.

2.5.1 Patch-Clamp-Konfigurationen

cell-attached Konfiguration

Bei dieser Konfiguration, die sich ergibt, wenn das hochohmige *Seal* zwischen Patchpipette und Zellmembran der Zelle hergestellt worden ist, können an der intakten Zelle die Ionenkanäle in dem *Patch* direkt unter der Patchpipette gemessen werden. Diese Methode hat ihre Vorteile in der Untersuchung von einzelnen Ionenkanälen, welche durch Zugabe von extrazellulären Wirkstoffen über sog. *second messenger* von zytosolischen Enzymen oder Zytoskelettkomponenten reguliert werden. Die Nachteile bestehen darin, daß erstens die intrazelluläre Ionenkonzentration nicht definiert ist und zweitens das tatsächliche Membranpotential nicht bekannt ist, da sich zu der definierten Spannung zwischen der Patchpipette und der Badelektrode noch das nicht bekannte Zellpotential addiert.

inside-out Konfiguration

Durch einfaches Abheben der Patchpipette von der am Deckglas adhärierenden Zelle aus einer intakten *cell-attached* Konfiguration heraus kann der *Patch* von der Zelle herausgelöst werden. In dieser zellfreien, sogenannten *inside-out* Konfiguration ist die zytosolische Seite des *Patches* der Badlösung zugewandt und somit löslichen Substanzen zugänglich. Über einen Austausch oder eine Substitution der im Bad befindlichen Elektrolyte lassen sich die Ionenselektivität und die Leitfähigkeit des

Kanals im *Patch* bestimmen. Ebenso können zytosolisch wirkende Aktivatoren oder Kanalblocker getestet werden. Der Nachteil dieser Konfiguration ist, daß bestimmten Ionenkanälen für ihre Funktion wichtige zytosolische Komponenten fehlen und sie deshalb im exzidierten *Patch* nicht mehr oder nur für einen sehr kurzen Zeitraum aktiv sind. Ebenso kann eine Vesikelbildung an der Spitze der Patchpipette nach dem Exzidieren zum Abbruch der Untersuchung führen.

Patch-Clamp-Untersuchungen am intakten Endothel von Gefäßsegmenten

Für Patch-Clamp-Untersuchungen am intakten Endothel sind prinzipiell Untersuchungen mit den gleichen Patch-Clamp-Konfigurationen, wie sie oben dargestellt sind, möglich. Der entscheidende Vorteil bei den Patch-Clamp-Untersuchungen am intakten Endothel gegenüber den Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten Zellen ist, daß endotheliale Ionenkanäle und ihre Eigenschaften (Dichte, Regulation etc.) *in situ* studiert werden können, ohne daß eine Zellisolierung und Kultivierung der Zellen mit der Gefahr des Verlustes von zelltypischen Eigenschaften nötig sind (Abb. 1). Der Nachteil der Patch-Clamp-Untersuchungen am intakten Endothel besteht in der elektrischen Kopplung der Endothelzellen untereinander, die eine Ganzzellstromableitung aufgrund des extrem niedrigen Zellwiderstandes praktisch nicht ermöglichen. Die auftretenden Ströme und Kapazitäten sind zu groß, um exakt kompensiert zu werden, und die elektrischen Widerstände zwischen gekoppelten Zellen sind nicht definiert.

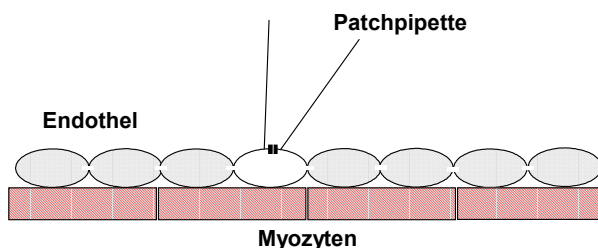


Abb. 1: Schematische Darstellung der *cell-attached* Patch-Clamp-Konfiguration am intakten Gefäßendothel.

2.5.2 Versuchsaufbau

Zur Vermeidung von störenden Schwingungen wurde die Meßanordnung und das Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Um eine elektrische Abschirmung zu erzielen, wurde der Meßplatz von einem Faraday-Käfig umgeben und alle leitenden Komponenten über einen gemeinsamen Massepunkt geerdet. Unter einem inversen Mikroskop wurde das Experimentierbad auf einem Kreuztisch befestigt. In den Plexiglasrand des Experimentierbades war eine Heizspirale eingelassen, die über ein 2-Kanalregelgerät eine konstante Temperatureinstellung der Badlösung auf 37°C ermöglichte. Ein Zu- und Ablaufsystem ließ einen schnellen Wechsel der Badlösung zu.

Der Patch-Clamp-Vorverstärker mit der Pipettenhalterung wurde auf einen Mikromanipulator befestigt, so daß eine Bewegung der Patchpipette in alle drei Raumrichtungen möglich war. Die Feinpositionierung der Patchpipette im μm -Bereich zur exakten Annäherung an die Zellmembran wurde über Piezoelemente gesteuert und erfolgte unter optischer Kontrolle. Bei der *Seal*-Bildung am intakten Endothel von Gefäßsegmenten wurde sich nur an der Veränderung des Pipetteneingangswiderstands, die sich bei der Berührung der Patchpipette mit der Zellmembran ergibt, orientiert.

Die Druckverhältnisse in der Patchpipette konnten über ein Schlauchsystem, welches an eine Wassersäule gekoppelt wurde, definiert verändert werden. Die mechanische Stimulation der Zellmembran in der Patchpipette (*Patch*) wurde über Anlegen eines definierten Drucks bzw. Unterdrucks (Sog) im Bereich von -50 mm Hg bis + 50 mm Hg ($1 \text{ mm Hg} = 133 \text{ Pa} = 1.36 \text{ cm WS}$) bewerkstelligt.

Dabei sind die Druckwerte, welche zur mechanischen Stimulation der Zellmembran und des darunter liegenden Zytoskeletts an die Patchpipette angelegt wurden, nur bedingt vergleichbar mit den *in vivo* auftretenden Blutdruckwerten. Diese Art der mechanischen Stimulation ist üblich für die Identifizierung von MSC im Rahmen von Patch-Clamp Untersuchungen.

Elektrische Komponenten

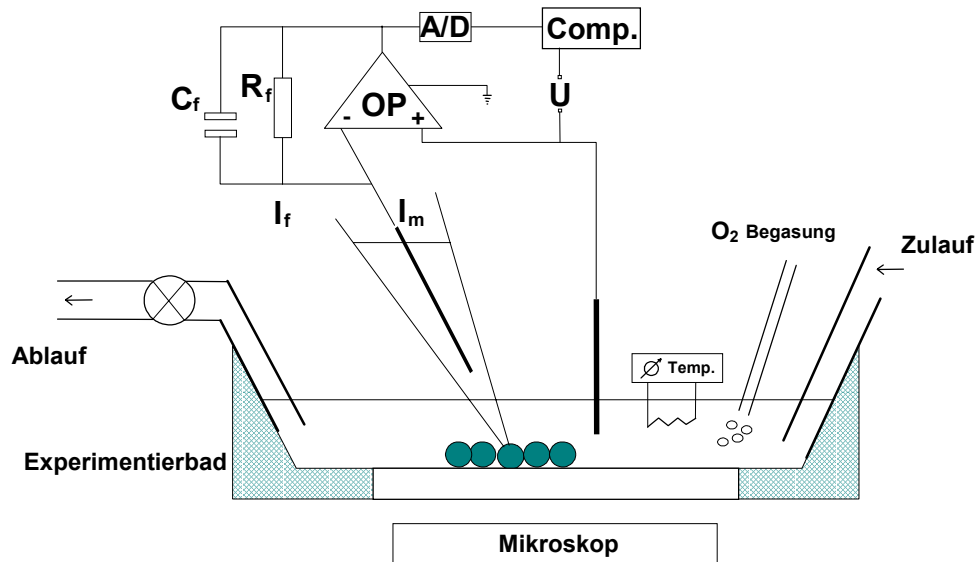


Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau. OP = Operationsverstärker; R_f = Referenzwiderstand; I_f = Referenzstrom; I_m = Meßstrom; C_f = Referenzkapazität; U = Spannung; A/D = Analog/Digital-Wandler.

Der Aufbau des Meßkreises kann aus der schematischen Darstellung entnommen werden (Abb. 2). Der invertierte Eingang (-) des Operationsverstärkers (OP) ist über einen Rückkopplungswiderstand (R_f) so mit seinem Ausgang verschaltet, daß der Meßstrom (I_m) an diesem Eingang kompensiert wird. Der Kompensationstrom (I_f) hat denselben Betrag wie der Meßstrom, aber eine entgegengesetzte Polarität. Am Ausgang des Operationsverstärkers liegt die Spannung $U = I_m \times R$ an und kann als Meßgröße weiterverarbeitet werden. Widerstandsänderungen wie z.B. durch Öffnen und Schließen von Ionenkanälen in der Zellmembran lassen sich als Änderungen der Ausgangsspannung (U) messen.

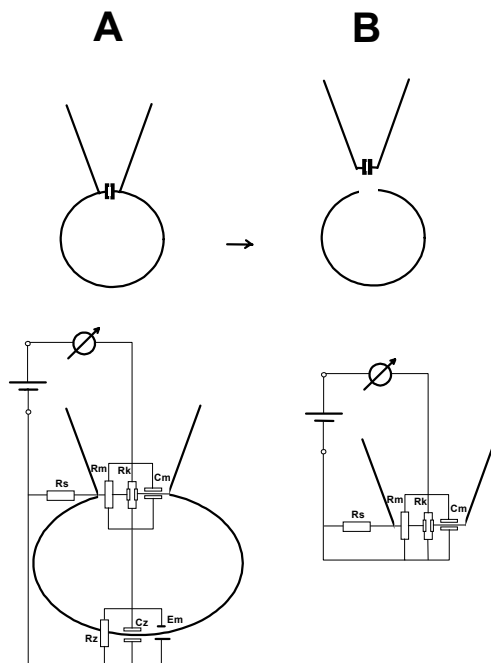


Abb. 3: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Konfigurationen und elektrischer Ersatzschaltbilder.

A) *cell-attached* Konfiguration; B) *inside-out* Konfiguration; R_s = Abdichtungswiderstand; R_m = Membranwiderstand des *Patch*; R_k = Kanalwiderstand; R_z = Zellwiderstand; C_m = Membrankapazität des *Patch*; C_z = Zellkapazität; E_m = Zellpotential.

Die Abbildung 3 zeigt die elektrischen Ersatzschaltbilder, die bei den beschriebenen Patch-Clamp Meßkonfigurationen vorliegen. Der Membranwiderstand des *Patch* (R_m) und der Widerstand des *Seals* (R_s) sind bei einer stabilen Abdichtung konstant. In der *cell-attached* Konfiguration (A) ist R_m um mehr als zwei Zehnerpotenzen größer als der Widerstand der gesamten Zellmembran (R_z). R_z ist deshalb vernachlässigbar. Bei der *inside-out* Konfiguration fällt R_z mit dem Ablösen des *Patch* von der Zelle weg. Die Änderung des Kanalwiderstands (R_k) durch Öffnen und

Schließen von Ionenkanälen führen zu deutlichen Veränderungen der Membranleitfähigkeit im *Patch* und damit zu meßbaren Änderungen im Elektrodenstromkreis.

Der Serienwiderstand im Elektrodenstromkreis, der im wesentlichen von der Konzentration und Beweglichkeit der Ionen sowie dem Spitzendurchmesser der Patchpipette bestimmt wird, wirkt als Spannungsteiler. Da er aber um mindestens 2 Zehnerpotenzen kleiner als der *Seal*-Widerstand ist, kann er vernachlässigt werden.

Patchpipetten und Elektroden

Die Patchpipetten wurden aus 7,5 cm langen Borosilikatkapillaren (Clark, Pangbourne, England) (Innendurchmesser 0,9 mm, Wandstärke 0,3 mm) mit einem automatischen Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller) horizontal in drei Erhitzungs- und Zugintervallen gezogen und die Spitzen anschließend in einem vierten Erhitzungsintervall poliert. Der elektrische Eingangswiderstand der Patchpipetten betrug in symmetrisch 140 mM KCl – Lösungen 4-6 M Ω . Dies entspricht einem ungefähren Durchmesser der Pipettenspitzenöffnung von 1 μ m.

Als Meß- und Referenzelektrode diente ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl-Elektrode).

2.5.3 Datenaufzeichnung und Auswertung

Der Patch-Clamp-Verstärker verstärkt die im Elektrodenkreis fließenden Ströme und konvertiert sie in entsprechende Spannungen. Das angelegte Klemmpotential konnte über einen externen Spannungsgeber auf einen gewünschten Wert zwischen +100 und -100 mV eingestellt werden. Durch das Klemmen des im Meßkreis fließenden Stroms auf null konnte auch das dazugehörige Zellpotential gemessen und auf einem Speicheroszilloskop beobachtet werden. Die analogen Strom- und Spannungswerte wurden nach Low-Pass Filterung (-3 dB, 800 Hz) von einem A/D-Wandler digitalisiert (Sample-Rate von 2 kHz) und auf Wechselplatten (Syquest, 44 MB) gespeichert.

Die Datenauswertung erfolgte für die Einzelkanalaufzeichnungen mit dem Auswerteprogramm "*Patch*" für den Atari ST (A. Rabe, Frankfurt).

Berechnung der Leitfähigkeit

Zur Erstellung einer Strom-Spannungskurve und für die Berechnung der Kanalleitfähigkeit (g) wurden die ausgemessenen Stromamplituden den Klemmpotentialen zugeordnet und die Datenpunkte mit einer Kurve angeglichen.

Bei linearen Strom-Spannungsbeziehungen wurden lineare Regressionen berechnet. Bei nicht-linearen Beziehungen, die sich z.B. ergeben, wenn neben der elektrischen noch eine chemische Triebkraft den Kanalstrom beeinflusst, wurden die Datenpunkte mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (1) angeglichen. Durch Minimierung der Fehlerquadratsumme wurde ein möglichst guter Näherungswert für die mittlere Leitfähigkeit (g^*) und das Umkehrpotential (E_{rev}) berechnet (Hille, 1984).

$$I = \frac{\frac{g^*_{Na}}{[Na]^*} [Na]_a + \frac{g^*_{K}}{[K]^*} [K]_a + \frac{g^*_{Cl}}{[Cl]^*} [Cl]_i - \left(\frac{g^*_{Na}}{[Na]^*} [Na]_i + \frac{g^*_{K}}{[K]^*} [K]_i + \frac{g^*_{Cl}}{[Cl]^*} [Cl]_a \right) * e^{VF/RT}}{1 - e^{VF/RT}} * V \quad (1)$$

Legende zu Gleichung 1: R steht für die allgemeine Gaskonstante, T ist die Temperatur in K, F die Faraday-Konstante; $[Ion]_i$ ist die Konzentration des betrachteten Ions auf der zytosolischen Seite des *Patches*, $[Ion]_a$ ist die Konzentration des betrachteten Ions auf der extrazellulären Seite. $[Ion]^*$ ist die maximale Konzentration, in der das betrachtete Ion in isotonischen Lösungen vorkommen kann (bei Säugern ca. 150 mM). g^*_{ion} ist die Referenzleitfähigkeit, die der Kanal in isotonischer Lösung hätte, wenn das betrachtete Ion symmetrisch in der Konzentration $[Ion]^*$ vorläge.

Berechnung der Ionenselektivität

Im Falle eines Ionengradienten über der Membran kann aus E_{rev} das Permeabilitätsverhältnis der Ionen und somit die Ionenselektivität des Kanals bestimmt werden. Mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für das Umkehrpotential (2) sind die Anteile von verschiedenen einwertigen Ionen am Gesamtpotential nach dem Permeabilitätskoeffizienten gewichtet. Eine Korrektur des Permeabilitätsverhältnis wurde für zweiwertige Ionen vorgenommen.

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}[Na]_a + P_K[K]_a + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_a} \quad (2)$$

$$E_{rev} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K[K]_a}{P_K[K]_i} \quad (3)$$

Bei einer sehr hohen Selektivität eines Kanals für ein Ion (hier z. B. $P_K \gg P_{Na}$ oder $P_K \gg P_{Cl}$) kann die Nernst-Gleichung (3) angewendet werden.

Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit

Die Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit erfolgte über Integration der Kanal-offenniveauflächen. Die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) errechnete sich als das Verhältnis der Fläche zwischen den gemessenen Stromwerten und dem Nullstromniveau und der Fläche zwischen dem höchsten Offenniveau und dem

Nullstromniveau. Die Flächen wurden durch Berechnung der entsprechenden Integrale bestimmt und das Verhältnis als Offenwahrscheinlichkeit (P_o) angegeben (4). Ein Kanal gilt definitionsgemäß als offen, wenn mehr als 50% des maximalen Einzelkanalstroms erreicht werden.

$$P_o = \frac{F_{x \text{ offen}}}{F_{\text{gesamt}}} \quad (4)$$

Vorzeichenkonvention

Alle Klemmpotentiale werden bei Einzelkanalaufzeichnungen aus Zellsicht angegeben, d.h. die angegebene Spannung entspricht der Spannung auf der zytosolischen Seite der Membran. Per Konvention werden Einwärtsströme von Kationen als negative Ströme nach unten gerichtet und Auswärtsströme von Kationen als positive Ströme nach oben gerichtet dargestellt.

2.5.4 Lösungen

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der Pipettenlösungen und der Badlösung aufgeführt, welche bei den Experimenten zu Einsatz kamen.

Pipettenlösungen

	Standard	Hoch – Calcium
KCl in mM	140	-
CaCl ₂ in mM	1	90
MgCl ₂ in mM	1	1
Hepes in mM	10	10
[Ca ²⁺]frei in mM	1	90
pH	7,4	7,4

Badlösung

Als Badlösung wurde „Earle’s MEM with Hepes“ (Biochrom, Berlin) verwendet. Sie enthielt 140 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ und 10 mM Hepes bei einem pH - Wert von 7,4.

2.6 Vergleichsuntersuchungen von salz-belasteten und unbehandelten Sabra-Ratten

Das Studiendesign der Vergleichsuntersuchungen von salz-belasteten und unbehandelten Sabra-Ratten ist zusammenfassend dargestellt:

1: Salz-belastete SBH/y (n=7) und SBN/y (n=7)

- Doppelblindstudie, randomisiert
- DOCA-Implantation im Alter von 4 Wochen und Verabreichung der Salz-Diät
- Blutdruckmessung vor der Behandlung und nach achtwöchiger Salz-Diät (im Alter von 12 Wochen)
- Messung der Kanaloffenwahrscheinlichkeit (P_o) bei -10, 0, 10, 20 und 30 mmHg Pipettendruck am intakten Endothel der Aorta und der Mesenterialarterie der SBH/y und SBN/y nach achtwöchiger Salzbehandlung
- Bestimmung der Kanalleitfähigkeit
- Ermittlung der absoluten Kanalzahlen
- Messung der Kanaldichte in Prozent der Versuche mit PAC-Aktivität (15 *Patches* / Mesenterialarterie; 10 *Patches* / Aorta)

2: Unbehandelte SBH/y (n=7) und SBN/y (n=7)

- Doppelblindstudie, randomisiert
- Schein – Operation im Alter von 4 Wochen und Ernährung der Tiere durch normale Fütterung und Wasser ad libitum

- Blutdruckmessung im Alter von 4 Wochen und im Alter von 12 Wochen
- Messung der P_o bei -10, 0, 10, 20 und 30 mmHg Pipettendruck am intakten Endothel der Aorta und der Mesenterialarterie der SBH/y und SBN/y nach der zweiten Blutdruckmessung
- Bestimmung der Kanalleitfähigkeit
- Ermittlung der absoluten Kanalzahlen
- Messung der Kanaldichte in Prozent der Versuche mit Kanalaktivität (15 *Patches* / Mesenterialarterie; 10 *Patches* / Aorta)

2.7 Statistische Auswertung

Subgruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon rank sum test) verglichen. Die Verwendung dieses nicht-parametrischen Testes empfahl sich aufgrund der kleinen Populationen. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant und $< 0,01$ als hoch signifikant erachtet. Die Werte werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) oder Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

In die statistische Auswertung wurden nur solche Patch-Clamp-Experimente einbezogen, bei denen der *Seal*-Widerstand $4 \text{ G}\Omega$ oder mehr betrug. Für die Bestimmung der P_o wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit nur Versuche in die statistische Auswertung einbezogen, bei denen die Messung bei allen Druckwerten an ein und demselben *Patch* erfolgen konnte.

Die *Seal*-Eigenschaften waren bei salz-belasteten und unbehandelten SBH/y und SBN/y nicht verschieden.

Die Anzahl der Experimente, in denen der PAC identifiziert werden konnte, stellt, als prozentualer Anteil der insgesamt durchgeführten Versuche, die Kanaldichte des PAC am Endothel der Aorta bzw. der Mesenterialarterie dar.