

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Bojana D. Stevanović

VAZOPRESIN I NEUROKARDIOGENE
KARAKTERISTIKE HIPERADRENERGIČKOG
STANJA KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH
PACOVA

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Bojana D. Stevanović

VASOPRESSIN AND NEUROCARDIOGENIC
CHARACTERISTICS IN HYPERADRENERGIC
STATE OF BORDERLINE HYPERTENSIVE
RATS

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021

Mentor:

Prof. dr Nina Japundžić Žigon, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Doc. dr Marija Stanković Stanojević, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Sanja Milutinović-Smiljanić, vanredni profesor, Opšta i oralna histologija i embriologija, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Bajić, Katedra za telekomunikacije i obradu signala, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

Mojoj porodici, najvećoj uzdanici i Vukiju, maminoj blistavoj zvezdici.

VAZOPRESIN I NEUROKARDIOGENE KARAKTERISTIKE HIPERADRENERGIČKOG STANJA KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA

REZIME

Vazopresin (VP) je važan regulator osmotske i kardiovaskularne ravnoteže. Međutim, brojna istraživanja sugeriraju da ima ulogu i u nastanku primarne hipertenzije. U ovoj studiji ispitivana je promena ekspresije gena za VP, V1a i V1b receptore (V1aR i V1bR) u paraventrikularnom jedru (PVN) hipotalamusa kao i neurokardiogene karakteristike granično hipertenzivnih pacova (BHR). U eksperimente su uključeni 12 nedelja stari mužjaci BHR soja i zdravih parnjaka *Wistar* pacova (WR) kao kontrole, kojima je prethodno ugrađen transmiter u aortu, za registrovanje krvnog pritiska (BP). Svi pacovi su raspoređeni metodom slučajnog izbora u četiri eksperimentalne grupe: 1) WR pod bazalnim uslovima; 2) BHR-ovi pod bazalnim uslovima; 3) BHR-ovi opterećeni solju; 4) BHR-ovi opterećeni solju i izloženi stresu. Neurokardiogeni parametri određeni su metodom spektralne analize BP-a i srčane frekvencije (HR), a senzitivnost barorefleksa (BRS) metodom sekvenci. Koncentracija VP-a u plazmi merena je radioimunoesejom (RIA). Nivo ekspresije gena za VP, V1aR i V1bR utvrđen je metodom RT-qPCR-a. Pod bazalnim uslovima BHR-ovi su imali povećanu ekspresiju gena za VP i V1bR u PVN-u, povišenu koncentraciju VP-a u plazmi, kao i porast BRS-a u odnosu na kontrole. Opterećenje BHR-ova solju dovelo je do smanjenja ekspresije gena za V1bR i opadanja vrednosti HR-a, u odnosu na bazalne uslove. Dodatno izlaganje stresu povećalo je BP i spektralne simpatičke markere. Istovremeno kod ovih pacova HR i VP u plazmi su se smanjili u odnosu na kontrolne vrednosti. Ovi rezultati sugeriraju da je povećanje genske ekspresije za VP i V1bR u PVN-u konstitutivna karakteristika BHR-ova i da nema ulogu u nastanku hipertenzije indukovane stresom.

Ključne reči: hipertenzija, vazopresin, vazopresinski receptori, osetljivost barorefleksa, kardiovaskularni varijabilitet, granična hipertenzija, paraventrikularno jedro

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK br.

VASOPRESSIN AND NEUROCARDIOGENIC CHARACTERISTICS IN HYPERADRENERGIC STATE OF BORDERLINE HYPERTENSIVE RATS

SUMMARY

Vasopressin is a well-recognized regulator of osmotic and cardiovascular homeostasis. However, numerous results suggest its role in development of primary hypertension. In this study we investigated gene expression of VP, and its receptors (V1aR i V1bR) in paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus, as well as neurocardiogenic characteristics of borderline hypertensive rats (BHR). Experiments included 12 weeks old BHR males, which were age-matched with normotensive WR controls. All animals were equipped with aorta-implanted radiotelemetry devices for continuous blood pressure (BP) measurements, and randomized in four experimental groups: 1) WRs under baseline conditions; 2) BHRs under baseline conditions; 3) salt-loaded BHRs; 4) salt-loaded plus stressed BHRs. Neurocardiogenic parameters were assessed by spectral analysis of BP and heart rate (HR), whereas baroreflex sensitivity (BRS) was analyzed by sequence method. Plasma VP was determined using radioimmunoassay (RIA). Expression of VP, V1aR and V1bR genes was determined by RT-qPCR. BHRs under baseline conditions had overexpression of VP and V1bR genes in the PVN, elevated plasma VP levels followed by increase in BRS compared with controls. Salt-loading of BHRs reduced expression of V1bR gene, as well as HR, compared to baseline conditions. Adding stress to salt-loading increased BP and spectral sympathetic markers in BHRs. Also, these animals exhibited lower HR and plasma VP concentrations compared to baseline conditions. These results suggest that elevated expression of VP and V1bR genes is a constitutive trait of BHRs, and is not a mechanism responsible for development of stress induced hypertension.

Key words: hypertension, vasopressin, vasopressin receptors, baroreflex sensitivity, cardiovascular variability, borderline hypertension, paraventricular nucleus

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDK No.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Primarna hipertenzija: definicija i etiologija	1
1.2. Uloga autonomnog nervnog sistema u nastanku hiperadrenergičkog stanja kod primarne hipertenzije.....	1
1.3. Granična hipertenzija.....	2
1.4. Uloga vazopresina u regulaciji kardiovaskularne i osmotske ravnoteže.	2
1.5. Funkcija i organizacija paraventrikularnog jedra.....	4
1.5.1 Neuroendokrini deo paraventrikularnog jedra.....	4
1.5.1.1. Aksonsko oslobađanje vazopresina i njegova periferna dejstva	5
1.5.1.2. Somatodendritsko oslobađanje vazopresina i autoregulacija aktivnosti magnocelularnih neurona.....	6
1.5.1.3. Dodatni izvori vazopresina u mozgu i njegova centralna dejstva	7
1.5.2. Autonomni deo paraventrikularnog jedra	7
1.5.3. Veza sekretornog i autonomnog paraventrikularnog jedra	8
1.5.4. Modulacija aktivnosti paraventrikularnog jedra	9
1.5.4.1. Uticaj promena osmolalnosti krvne plazme na aktivnost paraventrikularnog jedra.....	9
1.5.4.1.1. Uticaj osmotske stimulacije na oslobađanje vazopresina u cirkulaciju.....	9
1.5.4.1.1.1. Spoljašnji mehanizmi aktivacije magnocelularnih neurona.....	10
1.5.4.1.1.2. Unutrašnji mehanizmi aktivacije magnocelularnih neurona.....	10
1.5.4.1.2. Modulacija simpatičke nervne aktivnosti u nivou paraventrikularnog jedra usled osmotske stimulacije	11
1.5.4.2. Promena kardiovaskularnog statusa organizma i modulacija aktivnosti paraventrikularnog jedra usled aktivnosti baroreceptorskog refleksa.....	11
1.5.4.3. Promena aktivnosti paraventrikularnog jedra usled dejstva stresora.....	13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Eksperimentalne životinje	15
3.2. Hiruška procedura implantacije radiotelemetrijskog transmitera u abdominalnu aortu	15
3.3. Eksperimentalni protokol	16
3.4. Registracija i analiza signala arterijskog krvnog pritiska.....	17
3.4.1. Metoda sekvenci baroreceptorskog refleksa.....	17
3.4.2. Spektralna analiza i kardiovaskularni varijabilitet.....	18
3.5. Uzorkovanje krvi i moždanog tkiva za određivanje koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi i ekspresije iRNK za vazopresin i njegove receptore u paraventrikularnom jedru pacova.....	19
3.5.1. Određivanje koncentracije vazopresina u plazmi.....	19
3.5.2. Uzorkovanje tkiva paraventrikularnog jedra	20
3.5.3. Molekularno biološke analize tkiva paraventrikularnog jedra	20
3.5.3.1. Ekstrakcija ukupne RNK	20
3.5.3.2. Sinteza cDNK	21

3.5.3.3. Reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (RT-qPCR) i analiza podataka.....	22
3.6. Statistička obrada podataka.....	23
4. REZULTATI.....	24
4.1. Hemodinamski parametri, funkcija baroreceptorskog refleksa i kardiovaskularni kratkotrajni varijabilitet kod Wistar pacova pod bazalnim uslovima i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima.....	24
4.1.1. Hemodinamski parametri kod Wistar i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima.....	24
4.1.2. Funkcija baroreceptorskog refleksa kod Wistar i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima	24
4.1.3. Kratkotrajni varijabilitet krvnog pritiska i srčane frekvencije kod Wistar i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima.....	25
4.1.4. Hemodinamski parametri kod granično hipertenzivnih pacova pod različitim protokolima.....	27
4.1.5. Funkcija baroreceptorskog refleksa kod granično hipertenzivnih pacova pod različitim protokolima.....	28
4.1.6. Kratkotrajni varijabilitet krvnog pritiska i srčane frekvencije kod granično hipertenzivnih pacova pod različitim protokolima.....	29
4.2. Koncentracija vazopresina u plazmi i genska ekspresija vazopresina i njegovih receptora u paraventrikularnom jedru kod Wistar pacova pod bazalnim uslovima i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima.....	33
4.2.1 Koncentracija vazopresina u plazmi kod Wistar pacova pod bazalnim uslovima i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima.....	33
4.2.2. Genska ekspresija vazopresina u paraventrikularnom jedru kod Wistar pacova pod bazalnim uslovima i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima.....	34
4.2.3. Genska ekspresija V1aR i V1bR u paraventrikularnom jedru Wistar pacova pod bazalnim uslovima i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima.....	35
5. DISKUSIJA	37
6. ZAKLJUČCI	45
7. LITERATURA	46

1. UVOD

1.1. PRIMARNA HIPERTENZIJA: DEFINICIJA I ETIOLOGIJA

Hipertenzija je hiperadrenergičko stanje organizma praćeno povišenim krvnim pritiskom (engl. *blood pressure* – BP) [1,2]. Povećanje krvnog pritiska nastaje zbog suženja lumena arteriola i hipertrofije mišićnog dela zida arteriola, usled čega se smanjuje protok krvi ka organima. Vremenom, nedovoljan priliv krvi oštećuje najosetljivije organe [2]. Svako dugotrajno povećanje vrednosti sistolnog krvnog pritiska (engl. *systolic blood pressure* – SBP) iznad 140 mmHg i dijastolnog krvnog pritiska (engl. *diastolic blood pressure* – DBP) iznad 90 mmHg kod ljudi, smatra se hipertenzijom [3]. U svetu je ovo stanje dijagnostikovano kod 1,13 milijardi ljudi i procenjuje se da će do 2025. godine, broj obolelih od hipertenzije porasti na 1,65 milijardi ljudi [4,5]. S obzirom na to da je bolest često asimptomatska u početku (tahi ubica, engl. *silent killer*), neretko se utvrđuje tek nakon prvih komplikacija, od kojih najveću stopu mortaliteta imaju infarkt miokarda i mozga [1,6]. Postojeća terapija je delimično efikasna i podrazumeva polifarmaciju u uznapredovaloj fazi bolesti [7,8]. Stoga, od presudnog značaja za otkriće efikasnijih lekova je bolje poznavanje patofizioloških mehanizama primarne hipertenzije.

Do sada je definisano nekoliko faktora rizika (“hipertenziogeni faktori”), koji vode povećanju BP-a [1]. Među najučestalijim su gojaznost, insulinska rezistencija, stres i povišen unos soli kod osoba koje su osetljive na so [9,10]. Većina ovih faktora ima zbirni efekat - njihovo kumulativno dejstvo daje lošiju kliničku prognozu [1].

Uzrok većine hipertenzivnih stanja nije poznat, pa se često označavaju kao idiopatska ili primarna hipertenzija [11].

Varijacije u pritisku često imaju genetsku osnovu, što potvrđuju i brojne studije sprovedene na bliskim srodnicima, pa se zbog snažnog uticaja naslednih činilaca, hipertenzija često naziva i genetska hipertenzija [12,13]. Utvrđivanje genskih alela koji bi mogli da uzrokuju primarnu hipertenziju je vrlo kompleksno, usled postojanja velikog broja regulatornih mehanizama koji utiču na krvni pritisak [1,14]. Na primer, identifikovano je preko 10 gena koji imaju ulogu u regulaciji reapsorpcije vode i natrijuma (Na⁺) u bubrezima, a čije mutacije dovode do povećanja BP-a [15,16]. Dakle, veliki broj gena se može dovesti u vezu sa etiopatogenetskim mehanizmima koji vode razvoju primarne hipertenzije.

Primarna hipertenzija ima i važnu neurogenu komponentu (neurogena hipertenzija) [17]. Svaki vid centralne signalizacije koji izaziva hiperaktivaciju simpatičkog nervnog sistema (SNS) može rezultovati nastankom primarne hipertenzije [18,19]. Promene vazopresinskog sistema u mozgu često se dovode u vezu sa razvojem hipertenzije neurogenog porekla [20–22]. Takođe, pokazano je da manipulacija baroreceptorskim aferentnim vlaknima izaziva povećanje BP-a, što potvrđuje neurogeno poreklo primarne hipertenzije [18].

1.2. ULOGA AUTONOMNOG NERVNOG SISTEMA U NASTANKU HIPERADRENERGIČKOG STANJA KOD PRIMARNE HIPERTENZIJE

Autonomni nervni sistem (ANS) ima važno mesto u kontroli BP-a [23]. Glavne efektorske komponente nervne regulacije BP-a su minutni volumen srca i periferni otpor krvnih sudova.

Njihovom regulacijom ANS prilagođava funkciju kardiovaskularnog sistema, kako bi se zadovoljile metaboličke potrebe različitih organskih sistema.

Veza nervnog sistema i BP-a je definisana na nivou neurotransmitera, pre svega adrenalina (sintetiše se u srži nadbubrežne žlezde) i noradrenalina (oslobađa se na kraju nervnih završetaka simpatičkih neurona) i adrenergičkih receptora [24]. Tonus arteriola (rezultanta vazokostriktornih i vazodilatatornih dejstava na krvne sudove) se povećava aktivacijom α -adrenergičkih receptora, dok angažovanje β -adrenergičkih receptora u srcu izaziva porast minutnog volumena srca [25].

Veliki broj refleksnih mehanizama učestvuje u regulisanju aktivnosti i funkcije ANS-a. Autonomna refleksna kontrola je ključna u detekciji i korekciji spontanih promena pritiska, kako u mirovanju tako i pri određenim fiziološkim izazovima, kao što je stres [26,27]. Kada se naruše ovi regulatorni mehanizmi, može doći do autonomne disfunkcije, koja se manifestuje povećanim simpatičkim tonusom, a ponekad je praćena i odsustvom vagalne funkcije. Ukoliko se ovakav disbalans u radu ANS-a održava duže vreme, nastaje takozvano "hiperadrenergičko stanje", koje je svojstveno primarnoj hipertenziji [28,29]. Hiperadrenergičko stanje u primarnoj hipertenziji je potvrđeno direktno – merenjem eferentne simpatičke aktivnosti, ali i indirektno – merenjem nivoa adrenalina i noradrenalina u cirkulaciji i spektralnih markera simpatičke aktivnosti [11,19,30]. Kao posledica ovakvog stanja u organizmu, nastaju patološke promene koje vode u kardiovaskularna oboljenja [28].

1.3. GRANIČNA HIPERTENZIJA

Granična hipertenzija (engl. *borderline hypertension* – BH) je glavni faktor rizika za razvoj primarne hipertenzije i karakteriše se blago povišenim vrednostima pritiska [31]. Usled odsustva strukturalnih promena koje se javljaju u uznapredovalim stadijumima hipertenzije, BH je dobar model za izučavanje ranih promena u autonomnoj kontroli BP-a [32].

Na eksperimentalnom nivou, BH je simulirana na životinjskom modelu pacova granično hipertenzivnog soja (engl. *borderline hypertensive rats* – BHR), razvijenom od strane Lawler-a i saradnika [33]. Ovaj soj se u laboratorijskim uslovima dobija ukrštanjem ženki genetski spontano hipertenzivnih pacova i mužijaka normotenzivnih pacova. Vrednosti BP-a BHR-ova su više nego kod normotenzivnih sojeva i odgovaraju onima koje se sreću u BH kod ljudi [34]. Iako BHR-ovi genetsku predispoziciju za hipertenziju nasleđuju od hipertenzivnog roditelja, ovo stanje se neće spontano razviti, već tek kada se izlože nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine: povećanom unosu soli i stresu [35–37].

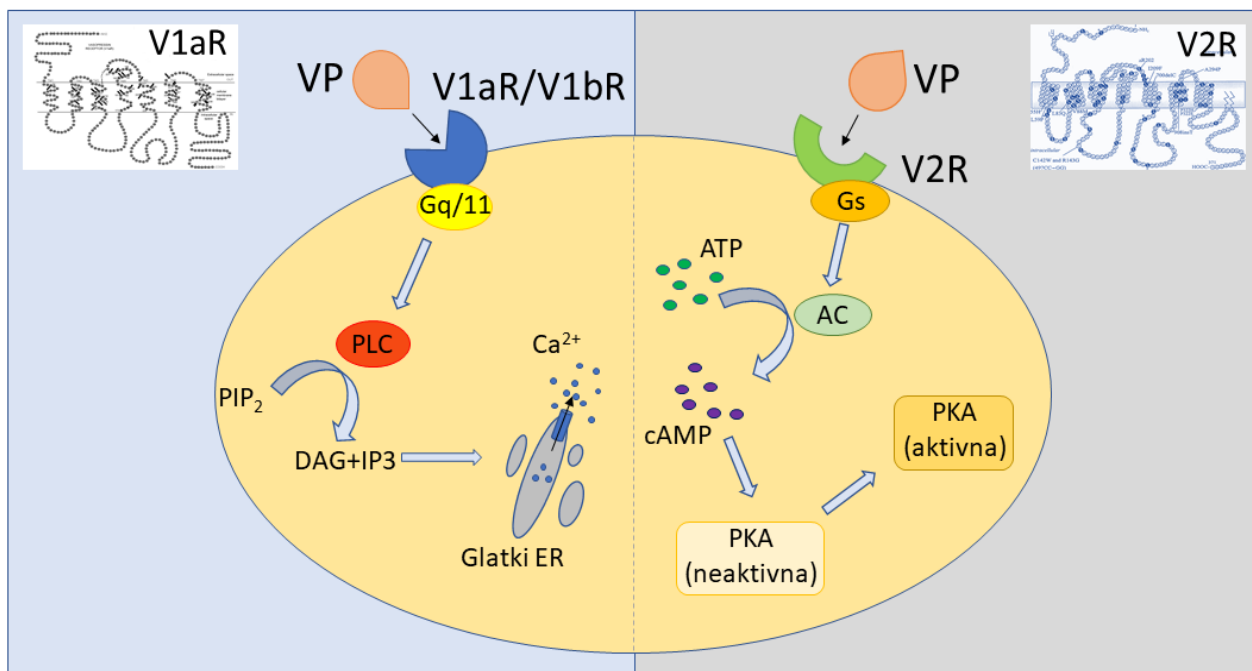
1.4. ULOGA VAZOPRESINA U REGULACIJI KARDIOVASKULARNE I OSMOTSKE RAVNOTEŽE

Vazopresin (VP) je hormon, koji na vrlo složen način utiče na regulaciju BP-a i održanje osmotske i kardiovaskularne homeostaze u organizmu [38]. Postoje podaci na eksperimentalnim životinjama i ljudima da VP ima ulogu u patogenezi primarne hipertenzije [39–44].

Gen za VP nalazi se na hromozomu 20 i kodira peptid sastavljen od devet aminokiselina [2,45,46]. Sve svoje biološke aktivnosti VP ispoljava posredstvom tri tipa receptora (engl. *vasopressin receptor* – VR): V1aR, V1bR i V2 [38,46]. Vazopresinski receptori su strukturno

slični ćelijski proteini. Poseduju sedam transmembranskih domena i spadaju u potfamiliju receptora koji su spregnuti sa G-proteinom (engl. *G-protein-coupled receptors* – GPCR). Ove receptore karakterišu različiti farmakološki profili, kao i drugačiji obrasci interakcije sa specifičnim unutarćelijskim sekundarnim glasnicima [47–49].

V1aR i V1bR su u sprezi sa Gq subjedinicom G-proteina, koja stimuliše izmenu guanozin difosfata (engl. *guanosine diphosphate* – GDP) u guanozin trifosfat (engl. *guanosin triphosphate* – GTP) i mobiliše fosfolipazu C, D i A2 na membranu. Aktivirana fosfolipaza vrši hidrolizu fosfatidilinozitola (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* – PIP₂), što za posledicu ima povećanje nivoa intracelularnog kalcijuma (icCa²⁺) (**Slika 1**) [50–52]. Nakon aktivacije, V1 receptori se brzo fosforilišu i desenzitizuju [53].



Slika 1. Signalni put aktivacije vazopresinskih receptora. VP – vazopresin; V1aR – vazopresinski receptor tipa 1a; V2R – vazopresinski receptor tipa 2; Gq/11 i Gs – sujednice G-proteina; PLC – fosfolipaza C; PIP₂ – fosfadiliinozitol-4,5-difosfat; PIP₃ – fosfadiliinozitol-3,4,5-trifosfat; AC – adenilat ciklaza; ATP – adenozin trifosfat; cAMP – ciklični adenozin monofosfat; PKA – protein kinaza A. Slika preuzeta i modifikovana iz *Ripoll* i saradnici, 2020 [54].

V2R je u sprezi sa Gs subjedinicom G-proteina i aktivira adenilat ciklazu i pokreće sintezu cikličnog adenozin monofofata (engl. *cyclic adenosine monophosphate* – cAMP) koji deluje na protein kinazu A (**Slika 1**), nakon čega se akvaporin 2 (engl. *aquaporin 2* – AQP-2) translocira u membranu tubularnog epitela sabirnih kanalića bubrega [51,54,55].

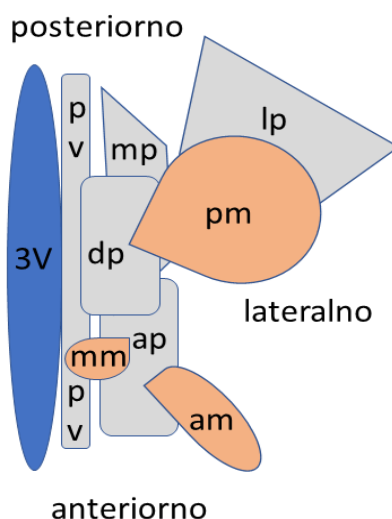
Vazopresinski receptori imaju široku distribuciju u organizmu i shodno tome regulišu brojne aktivnosti [56]. Podložni su strukturnim promenama, koje nastaju kao posledica mutacija i nukleotidnih polimorfizama, što može izmeniti dinamiku osolobađanja peptida, uticati na distribuciju samih receptora i dati nove fenotipove, koji vode u različita oboljenja [57].

1.5. FUNKCIJA I ORGANIZACIJA PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

Glavni izvor VP-a su magnocelularni neuroni (engl. *magnocellular neurons* – MCN) paraventrikularnog (engl. *paraventricular nucleus* – PVN) i supraoptičkog jedra (engl. *supraoptic nucleus* – SON) hipotalamusa [58].

PVN je visoko organizovana i jedinstvena efektorska struktura koja ima centralno mesto u regulaciji kardiovaskularnih i neuroendokrinih funkcija organizma radi održanja homeostaze [59,60]. Iako zauzima samo 1% mozga kičmenjaka, predstavlja glavno mesto integracije određenih aferentnih stimulusa kako bi se obezbedio adekvatan odgovor na njih [60,61]. Topografski se PVN nalazi u hipotalamusu, sa obe strane treće moždane komore [62]. Morfološki je izdvojen u tri magnocelularne (anteriorno, posteriorno i medijalno subjedro) i pet parvocelularnih (dorzalno, lateralno, medijalno, periventrikularno i anteriorno subjedro) oblasti (Slika 2) [60,62–65].

Sa aspekta funkcije, PVN se može podeliti na neuroendokrini (neurosekretorni) i autonomni deo PVN-a [64,66,67]. Disbalans u odnosu ovih funkcionalno odvojivih celina PVN-a, rezultuje u izmenjenom odgovoru na senzorne ulazne informacije, koji je karakterističan za patološka stanja poput hipertenzije [68].



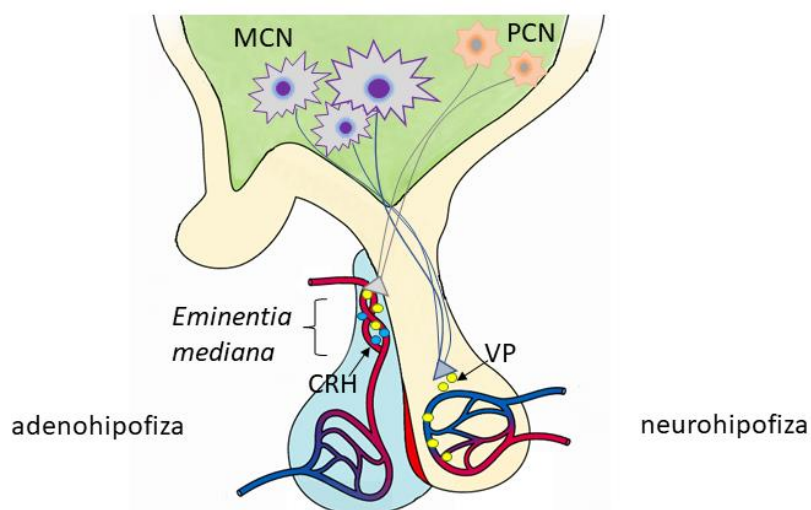
Slika 2. Šematski prikaz citoarhitektonike subjedara PVN-a. 3V – treća moždana komora; am – anteriorno magnocelularno; ap – anteriorno parvocelularno; dp – dorzalno parvocelularno; lp – lateralno parvocelularno; mm – medijalno magnocelularno; mp – medijalno parvocelularno; pm – posteriorno magnocelularno; pv – periventrikularno parvocelularno. Slika preuzeta i modifikovana iz Pyner i saradnici, 2009 [60].

1.5.1 NEUROENDOKRINI DEO PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

Sekretorna svojstva PVN-a, važna za kardiovaskularnu i osmotsku homeostazu, ogledaju se u aktivnosti MCN-a, dok je neuroendokrini odgovor na stres vezan za parvocelularne neurone (engl. *parvocellular neurons* – PCN), koji sintetišu kortikotropin-oslobađajući hormon (engl. *corticotropin releasing hormone* – CRH) i učestvuju u aktivaciji hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (hypothalamic–pituitary–adrenal – HPA) ose [59].

1.5.1.1. Aksonsko oslobađanje vazopresina i njegova periferna dejstva

Magnocelularni neuroni sintetiziraju prekursor VP-a i oko 85.000 ovih molekula se skladišti u velike, subcelularne vezikule u telu, dendritima i aksonima, u kojima čekaju signal za sekreciju [69]. Aksonske projekcije sekretornih MCN-a se pružaju do zadnjeg reznja hipofize (neurohipofiza), gde se vrši oslobađanje VP-a kao hormona u sistemsku cirkulaciju (**Slika 3**) [64].



Slika 3. Neuroendokrini deo PVN-a. MCN – magnocelularni neuroni; PCN – parvocelularni neuroni, VP – vazopresin; CRH – kortikotropin oslobađajući hormon. Slika preuzeta i modifikovana iz *Koshimizu i saradnici, 2012* [49].

VP u cirkulaciji doseže udaljene receptore i učestvuje u regulaciji brojnih procesa u organizmu. Njegove najbolje izučene uloge, važne za kardiovaskularnu i osmotsku homeostazu, su učešće u vazokonstrikciji – kontrakciji glatke muskulature krvnih sudova i reapsorpciji vode u bubrežnim tubulima [66,70,71].

Poznato je da svoje vazokonstriktorno dejstvo VP vrši angažovanjem Va1R na krvnim sudovima. *In vitro* studije potvrdile su da je VP izraženi stimulator glatke muskulature [38,70]. Ipak, u *in vivo* fiziološkim uslovima neophodna je značajna koncentracija VP-a da se postignu efekti na povećanje BP-a [41]. Stoga, smatra se da VP dominantno dejstvo na BP ipak ostvaruje svojim centralnim efektima, a ne kroz njegovo periferno vazokonstriktorno dejstvo [38,72]. Dakle, vaskularni V1aR imaju mali uticaj u regulaciji BP-a pod normalnim fiziološkim uslovima, ali su važni u patofiziološkim stanjima poput hipovolemije i hipotenzije [49]. Međutim, VP u nekim krvnim sudovima (npr. u plućima) izaziva vazodilataciju, angažovanjem V1aR ili V2R preko aktivnosti azot monoksida (engl. *nitrogen oxide* – NO) [38,73–75]. Osim vazokonstriktorne aktivnosti, V1aR na periferiji učestvuju u regulaciji velikog broja fizioloških mehanizama u organizmu, koji nisu uključeni u kardiovaskularnu i osmotsku homeostazu, kao što su: agregacija trombocita, oslobađanje faktora koagulacije, metabolizam jetre, kontrakcija uterusa i proliferacija ćelija, sekrecija angiotenzina II i drugo [51,76–80].

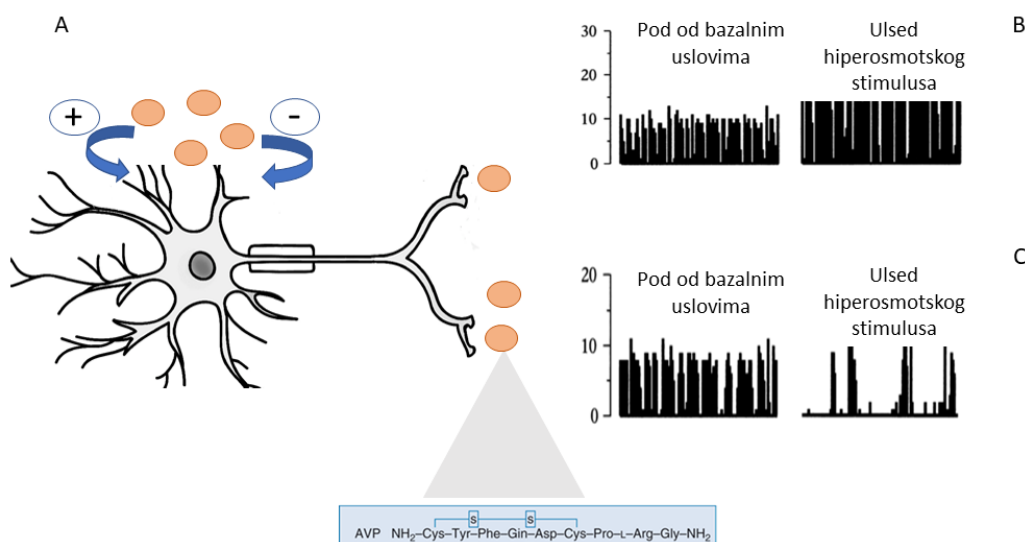
V2R su medijatori reapsorpcije vode u bubrežima i regulišu gensku ekspresiju AQP-2 i njihovu ugradnju u plazma mebranu ćelije [81–83]. Prisutni su u lumenu nishodnog dela Henlejeve petlje i u sabirnim kanalićima bubrega [84]. Zahvaljujući ovoj ulozi, VP se često naziva i antidiuretički hormon (engl. *antidiuretic hormone* – ADH) [85].

Iako su periferna dejstva VP-a uglavnom vezana za anagažovanje V1aR i V2R, informaciona ribonukleinska kiselina (iRNK) za V1bR je detektovana u mnogim tkivima: u srži nadbubrežne žlezde, bubrezima, pankreasu, srcu, slezini i drugo [56].

1.5.1.2. Somatodendritsko oslobađanje vazopresina i autoregulacija aktivnosti magnocelularnih neurona

Osim što se VP oslobađa u krvnu plazmu, dokazano je da se njegova sekrecija iz MCN-a odigrava i na somatodendritskom nivou (**Slika 4A**), gde su eksprimirani V1aR i V1bR [86–92]. Shodno kvalitetu i intezitetu stimulusa, MCN nezavisno ili koordinisano regulišu njihov dendritski transport nasuprot aksonskom [93]. Pokazano je da postoji razlika u sadržaju vezikula koje su predodređene za aksonsko i somatodendritsko otpuštanje. Vezikule sa VP-om koji će biti otpušten u međučelijski prostor, sadrže i galanin, dok one koje putuju ka neurohipofiznim aksonima nose samo VP [94]. Za razliku od aksona, dendriti poseduju kapacitet za sintezu proteina [95,96]. Dendritsko oslobađanje, bez sistemskog otpuštanja VP-a je praćeno povećanjem iRNK za VP [97]. Iz tog razloga merenje VP u plazmi nije pouzdan pokazatelj sinteze VP-a u mozgu [89,95–97]. Egzocitoza VP-a u dendritima zavisi od povećanja $icCa^{2+}$ [98]. Osim toga, porast $icCa^{2+}$ unutar ćelije omogućava pripremu (engl. *priming*) samih neurona za nadolazeće stimulse, povlačenjem vazopresinskih vezikula iz rezervnih depoa u dendritima [99–102].

Magnocelularni neuroni ne oslobađaju VP kontinuirano, već ih odlikuje poseban obrazac fazne aktivnosti otpuštanja VP-a, koji čine naizmenični periodi aktivnosti i “tišine”. Različiti unutrašnji i spoljašnji stimulusi mogu da menjaju obrazac fazne aktivnosti, pa tako VP oslobođen iz dendrita MCN-a, može da modifikuje ovaj obrazac ili da dovede do njegovog uspostavljanja (**Slika 4**) [103–105].



Slika 4. Autoregulacija i fazna aktivnost MCN-a. A – autoregulatorna dejstva dendritski oslobođenog VP-a; B – fazni obrazac MCN usled hiperosmotskog stimulusa; C – fazni obrazac MCN-a usled hiposmotskog stimulusa; MCN – magnocelularni neuron; VP – vazopresin. Slika preuzeta i modifikovana iz Hussy i saradnici, 2000 [106] i sa [https://www.researchgate.net/publication/307962039 Applications of Kernel Machines to Structured Data](https://www.researchgate.net/publication/307962039_Applications_of_Kernel_Machines_to_Structured_Data).

Efekat koji će intranuklearni VP imati na MCN zavisice od njihove prethodne aktivnosti. Najčešće opisano dejstvo je inhibitorno [107,108] i smatra se da je ovo jedina prava autoregulacija [102]. Ipak, postoje dokazi i o ekscitatornoj autoregulaciji [109], bar kod sporo

aktivirajućih MCN-a [96,103,110] kao i ekscitaciji susednih MCN-a, koji su neaktivni (**Slika 4A**) [86]. Takođe, neke studije ukazuju da intranuklearni VP nije imao nikakvog uticaja na fazni obrazac MCN-a, već depolarizuje susedne interneurone koji se projektuju do njih [111]. Sveukupno, ovaj vid regulacije vrši optimizovanje odgovora čitave populacije neurona u zavisnosti od fizioloških zahteva organizma [103].

1.5.1.3. Dodatni izvori vazopresina u mozgu i njegova centralna dejstva

Brojne studije pokazuju prisustvo V1aR i V1bR širom CNS-a [112]. Osim što sam CNS može biti izvor endogenog lokalnog VP-a, VP iz cirkulacije može proći kroz krvno-moždanu barijeru i ispoljiti svoja dejstva na moždanom tkivu [96].

Poznato je da V1aR posreduju u raznim moždanim funkcijama, kao što su komunikacija interneurona, hranjenje, termoregulacija, cirkadijalni ritmovi, pamćenje, socijalno i seksualno ponašanje [78,113]. Važno je napomenuti učešće V1aR-a u modifikaciji baroreceptorskog refleksa (BRR) u nivou *areae postremae* (AP) [114], kao i u modulaciji simpatičkog pražnjenja ka srcu, krvnim sudovima i bubrezima [60].

Aktivnost V1bR u CNS-u najbolje je opisana kroz njihovo učešće u odgovoru HPA ose na stres [115]. Dorzalni medijalni PCN PVN-a sintetiše CRH, koji stimuliše oslobađanje adrenokortikotropnog hormona (engl. *adrenocorticotropic hormone* – ACTH) iz kortikotropnih ćelija prednjeg režnja hipofize. Ovo je početni korak u aktivaciji HPA ose u odgovoru na stres. Oko 50% PCN-a PVN-a osim CRH sintetišu i VP kao sekretagog [64,65,116–118]. Primećeno je da se odnos nivoa CRH:VP menja u zavisnosti od tipa stresa koji deluje na organizam [119]. Putem aksonskog transporta, VP ulazi u portalni krvotok u nivou *eminetiae medianae*, kojim stiže do kortikotropnih ćelija, gde angažuje V1bR i stimuliše oslobađanje ACTH u cirkulaciju (**Slika 3**) [59].

Osim neurohipofize, V1bR se mogu pronaći u limbičkom sistemu i prefrontalnom korteksu, gde učestvuju u genezi anksioznosti i depresije i menjaju ponašanje u odgovoru na stres [2,120]. Potvrđeno je prisustvo V1bR-a i u PVN-u, ali je njihova funkcija slabo istražena [91,112,121].

1.5.2. AUTONOMNI DEO PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

Paraventricularno jedro ima ulogu u povećanju simpatičkog pražnjenja na krvne sudove i srce, koje se sreće u hipertenziji. Studije na spontano hipertenzivnim pacovima (engl. *spontaneously hypertensive rats* – SHR) su pokazale da je ovo posledica nepotpune inhibicije i pojačanog simpatičkog ekscitatornog uticaja na presimpatičke neurone PVN-a [122]. Autonomni PVN sastoji se od topografski organizovane heterogene populacije ćelija, različitih morfoloških i fizioloških osobina [122,123]. Određene grupacije preautonomnih neurona PVN-a kontrolišu funkcionalno različite simpatičke i parasimpatičke centre u mozgu i kičmenoj moždini (lat. *intermediolateral nucleus* – IML, *nucleus tractus solitarius* – NTS, dorzalno motorno jedro vagusa – DMV i rostralna ventolateralna medula – RVLM), menjajući autonomni odgovor usmeren ka kardiovaskularnom i renalnom sistemu [122,124–127].

Postoje bar tri neuronska kola, putem kojih PVN menja simpatički tonus [60]:

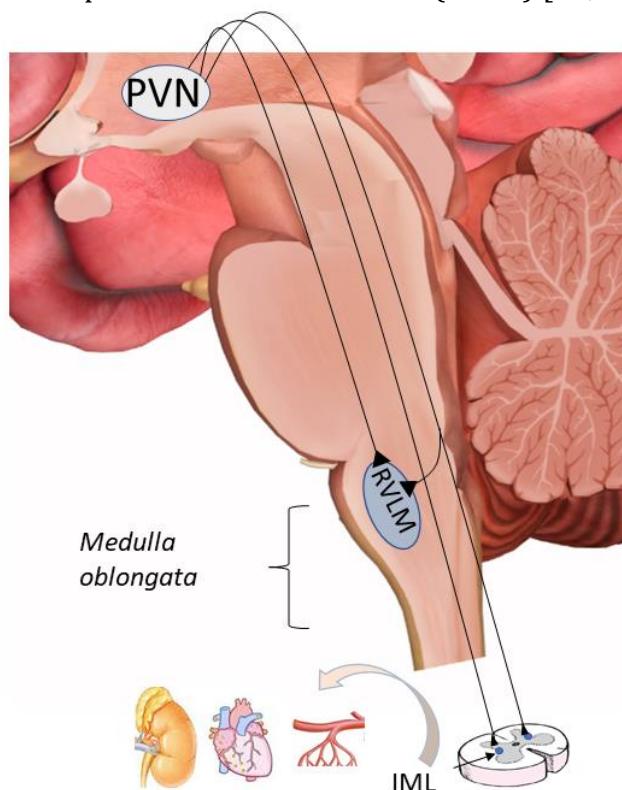
1) Direktno kolo – čine presimpatički neuroni PVN-a, koji se projektuju do tela simpatičkih preganglijskih neurona (engl. *sympathetic preganglionic neurons* – SNP) u IML-u. Ove direktne projekcije su od velike važnosti za kardiovaskularnu regulaciju, jer IML predstavlja mesto

finalne integracije u CNS-u, odakle polaze nervi koji utiču na rad krvnih sudova, srca, bubrega i srži nadbubrežne žlezde [60,128–131].

2) Indirektno kolo – čine presimpatički neuroni PVN-a, koji se projektuju do presornog regiona u RVLM-u, jednom od pet preomotornih jedara u mozgu, koji je odgovoran za tonično održavanje simpatičke aktivnosti. Od neurona RVLM-a polaze aksoni koji se pružaju do SPN-a u torakolumbalnom IML-u i na ovaj način indirektno menjaju simpatički uticaj na kardiovaskularni sistem [62,127,132].

3) Dvojno kolo – čini 30% neurona PVN-a, čiji aksoni šalju projekcije do SPN-a u IML-u, ali daju i kolaterale ka RVLM-u, regulišući simpatičku aktivnost direktno i indirektno (**Slika 5**) [62].

Različiti peptidi mogu biti medijatori neuronske transmisije. VP učestvuje u prenosu neuronskih signala kod 40% neurona koji se projektuju do kičmene moždine. To su prevashodno neuroni u lateralnom i ventralnom delu medijalne parvocelularne regije, dok manji udeo aksona dolazi iz dorzalnog parvocelularnog regiona [133]. U svojoj masi kičmene moždine na telu SPN-a prisutni su V1aR [134]. Pokazano je da aktivacijom ovih receptora u nivou donjeg dela torakalne kičmene moždine, VP ostvaruje kardioakceleratorni i presorni efekat i povećava renalnu simpatičku nervnu aktivnost (RSNA) [60,133–135].



Slika 5. Nishodni neuronski putevi PVN-a koji učestvuju u regulaciji simpatičke aktivnosti. PVN – paraventrikularno jedro; RVLM – rostralna ventrolateralna medula; IML – intermediolateralno jedro sive mase kičmene moždine. Slika preuzeta i modifikovana sa <https://www.innerbody.com/image/nerv02.html>.

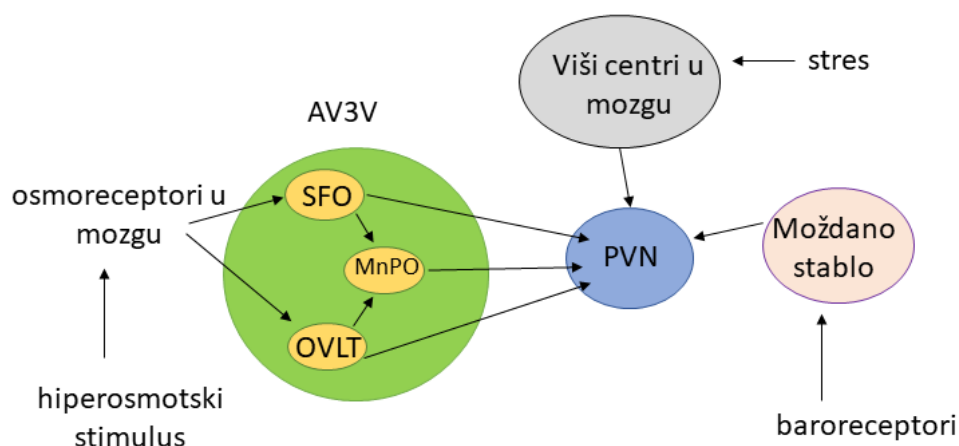
1.5.3. VEZA SEKTRETORNOG I AUTONOMNOG PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

Pored autoregulatorne aktivnosti na MCN, VP moduliše aktivnost i okolnih ćelija, putujući kroz međućelijski prostor, što ga kvalifikuje kao neurotransmiter [96,136]. Dendritsko oslobađanje je nesinaptičko i VP može dugo da opstane u vanćelijskoj sredini i dosegne udaljena

mesta delovanja. Parakrina aktivnost VP-a zavisi od njegovog ukupnog nivoa u međucelijskom prostoru. Osim dejstva na aktivnost okolnih MCN-a, pokazano je da VP ima efekat i na presimpatičke PCN i to angažovanjem V1aR na telima ovih neurona [67,99].

1.5.4. MODULACIJA AKTIVNOSTI PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

Paraventricularno jedro poseduje izvesnu dinamičnost i plastičnost ekspresije neuropeptida, koje su visokozavisne od hormonskog okruženja i/ili neuronske stimulacije njegovih ćelija [59]. Ovo jedro u svakom trenutku prima signalne informacije o različitim fiziološkim parametrima u telu. Za modulaciju kardiovaskularne ravnoteže u nivou PVN-a, ključni su osmotski i kardiovaskularni status tela, ali i negativni uticaji stresnih stimulusa iz spoljašnje i unutrašnje sredine (**Slika 6**). Smatra se da je u hipertenziji narušen balans između ekscitatornih i inhibitornih stimulusa koji deluju na PVN [59,122,137]



Slika 6. Modulacija aktivnosti PVN-a pod uticajem osmolalnosti krvne plazme, BRR-a i stresa. AV3V – anteroventralne III moždana komora; PVN – paraventricularno jedro; SFO – subfornikalni organ; OVLT – *organum vasculosum laminae terminalis*; MnPO – srednje preoptičko jedro. Slika preuzeta i modifikovana iz Qin i saradnici, 2018 [138].

1.5.4.1. Uticaj promena osmolalnosti krvne plazme na aktivnost paraventricularnog jedra

Povećan unos soli može dovesti do hidromineralnog disbalansa i povećanja Na^+ i osmolalnosti u krvi, što predstavlja jedan od glavnih rizika za razvoj hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti [139]. Poznato je da osmotska stimulacija izaziva dramatičan homeostatski odgovor PVN-a, koji podrazumeva koordinisanu aktivaciju magnocelularnih i parvocelularnih presimpatetičkih neurona, što vodi povećanju VP-a u plazmi i istovremenom porastu simpatičkog pražnjenja ka periferiji [140,141].

1.5.4.1.1. Uticaj osmotske stimulacije na oslobađanje vazopresina u cirkulaciju

Uvećanje osmolalnosti od samo 1% može stimulisati sintezu i sekreciju VP-a u MCN [142]. MCN detektuju osmolalnost zahvaljujući spoljašnjim i unutrašnjim mehanizmima i sintetišu adekvatnu količinu VP-a za potrebe regulisanja ekskrecije vode [102,143].

1.5.4.1.1.1. Spoljašnji mehanizmi aktivacije magnocelularnih neurona

Svaki MCN prima nekoliko hiljada aferentnih projekcija iz delova mozga koji prenose informacije o stanju hidratisanosti organizma. Najvažnije su one projekcije koje pristižu iz regiona periventrikularne anteroventralne treće komore (engl. *anteroventral third ventricle* – AV3V). Pokazano je da lezije ovog regiona ukidaju sposobnost vazopresinskih ćelija da odreaguju na povećanu osmolalnost. U AV3V se nalaze cirkumventrikularni organi (engl. *subfornical organ* – SFO i lat. *organum vasculosum laminae terminalis* – OVLT), kao i medijalni preoptički nukleus (engl. *medial preoptic nucleus* – MnPO), koji funkcioniše kao koordinacioni centar za osmoregulatorne funkcije [144–146]. Povećanje osmolalnosti krvne plazme vodi aktivaciji neurona cirkumventrikularnih neurona OVLT-a i SFO-a [144,147]. SFO i OVLT su bogato vaskularizovani fenestriranim kapilarima i u odsustvu krvno-moždane barijere njihovi osmosenzitivni neuroni brzo detektuju promene u krvnoj plazmi. Od ovih neurona polaze direktne ili indirektno (preko MnPO) simpatoekscitatorne glutamatergičke ili angiotenzinske projekcije ka PVN-u [144,148], dok su inhibicioni uticaji posredovani gama aminobuternom kiselinom (engl. *gamma aminobutyric acid* – GABA) [102]. Ponekad, u fiziološki zahtevnim uslovima (kao što je hiperosmotski stimulus), GABA menja svoje dejstvo u ekscitatorno, što pojačava stimulaciju lučenja VP-a u MCN [149].

Osmolalnost utiče i na faznu aktivnost MCN-a, pa samim tim i na oslobađanje VP-a u sistemsku cirkulaciju. Tokom hiperosmotske stimulacije ili hemoragije, MCN uspostavljaju ili pojačavaju svoju faznu aktivnost (**Slika 4B**) [150–152], što vodi porastu koncentracije VP-a u plazmi [153]. Suprotno tome, hipoosmotski stimulus karakteriše obrazac smanjene aktivnosti (**Slika 4C**) [154–156]. Dodatna kontrola se postiže od strane intranuklearno osolobodenog VP-a [103].

1.5.4.1.1.2. Unutrašnji mehanizmi aktivacije magnocelularnih neurona

Magnocelularni neuroni su sami po sebi osmosenzitivni i direktno reaguju na osmotski pritisak njihove okoloćelijske sredine [155,157]. Bez obzira što se nalaze iza krvno-moždane barijere, okruženi su gustom kapilarnom mrežom, pa je osmotski pritisak vanćelijske sredine približno jednak onom u plazmi. Osmosenzitivnost MCN-a je posledica osobina koje poseduje njihova ćelijska mebrana [155]. Plazma mebrana MCN-a sadrži mehanosenzitivne katjonske kanale koje se inaktiviraju istezanjem i odgovorni su za depolarizaciju neurona usled hiperosmotske stimulacije [137,143]. Naime, sa porastom osmotskog pritiska, MCN se skupljaju. Ovaj proces je reverzibilan i zavisi od funkcije aktinskog citoskeleta [158]. Kao rezultat otvaranja katjonskih kanala, raste voltažno-nezavisna ulazna katjonska struja, koja vodi depolarizaciji i povećanoj osetljivosti neurona na predstojeće dolazne stimulse. Ipak, ovakva depolarizacija, koja je posledica isključivo osmotskih promena, nije dovoljna za generisanje akcionog potencijala. Membranski potencijal je nestabilan, usled brojnih aferentnih stimulusa koje primaju MCN. Do nastanka akcionog potencijala doći će tek kada kolebanja membranskog potencijala dosegnu vrednosti praga nadražaja. Na ovaj način obezbeđuje se graduisan odgovor na osmotsku stimulaciju i širi se dinamički opseg aktivnosti MCN-a [137].

Takođe, prilikom porasta osmotskog sadržaja u okoloćelijskom matriksu raste i nivo Na⁺, koji pojačava odgovor MCN na hiperosmolalnost [143]. Pored toga, povećanje osmolalnosti dovodi do bubrenja i okolnih astrocita, što ima za posledicu oslobađanje taurina, koji preko glicinskih receptora izaziva inhibiciju sekrecije VP-a [106].

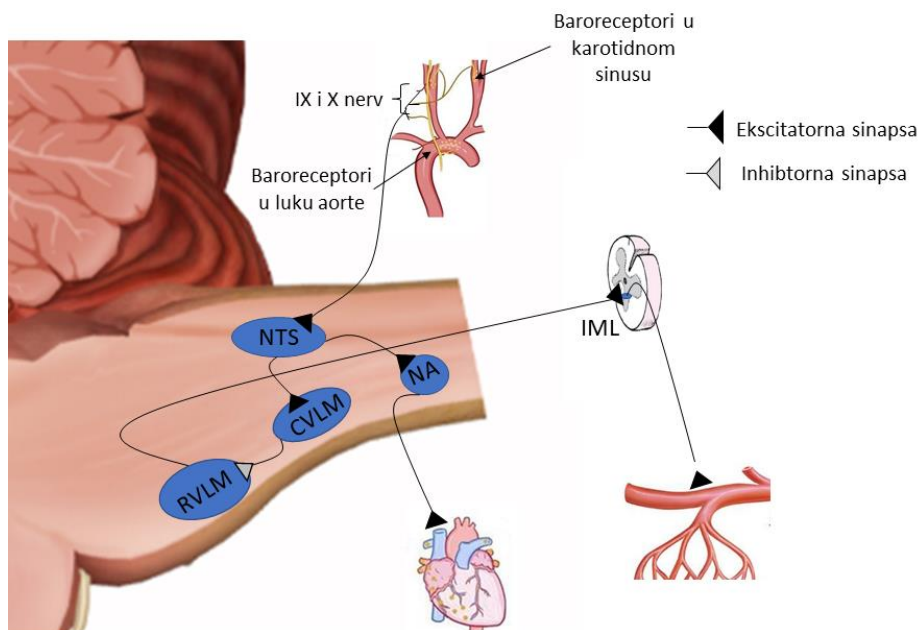
1.5.4.1.2. Modulacija simpatičke nervne aktivnosti u nivou paraventrikularnog jedra usled osmotske stimulacije

Poznato je da PVN igra važnu ulogu u povećanju simpatoekscitacije usled osmotske stimulacije. Mehanizmi koji stoje iza prenaplašene aktivnosti SNS-a posredovane PVN-om nisu do kraja razjašnjeni. Nekoliko studija je ukazalo da je najverovatniji uzročnik aktivacije presimpatičkih PCN-a, zapravo VP oslobođen iz magnocelularnog regiona [67,139]. On svoje parakrino dejstvo ispoljava angažovanjem V1aR-a na telima presimpatičkih neurona, čime se uvećava simpatičko pražnjenje ka srcu, krvnim sudovima i bubrezima, doprinoseći porastu BP-a i aktivaciji neurogene komponente hipertenzije [67,139]. Principi dejstva osmotske stimulacije na aktivnost PVN-a su dobar primer koordinisane aktivnosti neuroendokrinog i autonomnog dela PVN-a.

1.5.4.2. Promena kardiovaskularnog statusa organizma i modulacija aktivnosti paraventrikularnog jedra usled aktivnosti baroreceptorskog refleksa

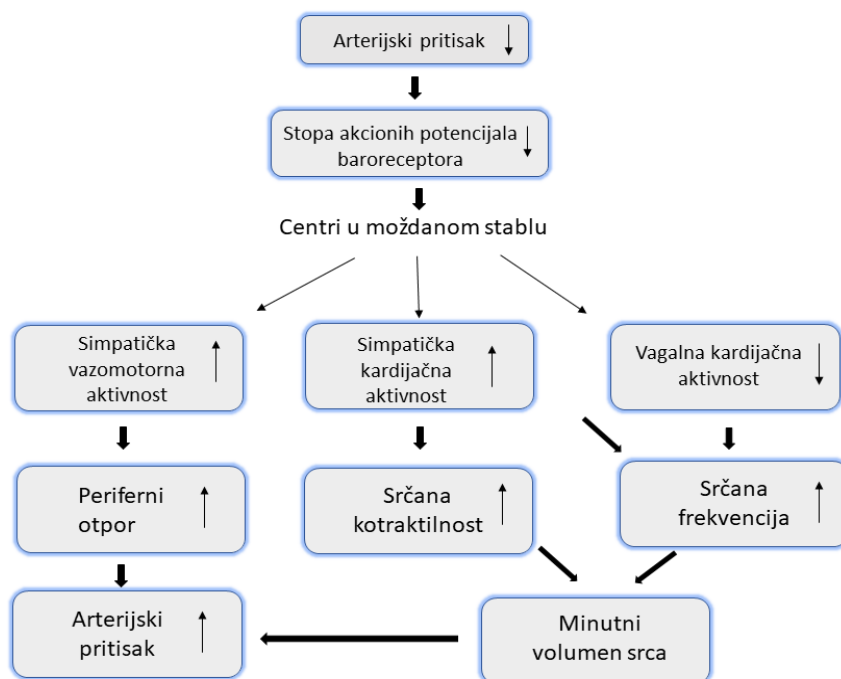
Funkcija BRR-a je izmenjena kako u eksperimentalnoj hipertenziji [159–162], tako i u primarnoj hipertenziji kod ljudi [161,162]. BRR je jedan od najvažnijih kardiovaskularnih refleksa i funkcioniše po principu negativne povratne sprege [163]. Glavni je mehanizam za kontrolu krvnog pritiska u kratkoročnom smislu i teži da smanji kolebanja arterijskog pritiska, koja se dešavaju pod različitim spoljnim uticajima [164]. Poslednjih godina sve je više dokaza koji ističu važnost BRR-a i u dugoročnoj regulaciji krvnog pritiska [165,166].

Svaka promena pritiska u organizmu detektovana je od strane baroreceptora. To su receptori osetljivi na istezanje, koji se nalaze u luku aorte i karotidnom sinusu [163]. Od baroreceptora polaze glutamatergička ekscitatorna aferentna vlakna, koja ulaze u sastav *nervus glossopharyngeus*-a (IX kranijalni nerv) i *vagus*-a (X kranijalni nerv). Mesto završetka ovih projekcija je NTS u dorzomedijalnoj meduli. Iz NTS-a polaze aksoni glutamatergičkih neurona drugog reda koji se pružaju do kardijačnih vagalnih motoneurona u *nucleus ambiguus*-u (NA) ili interneurona u kaudalnoj ventrolateralnoj meduli (engl. *caudal ventrolateral medulla* – CVLM). Iz CVLM-a kreću projekcije GABA neurona, koji formiraju sinapse sa simpatičkim premotornim neuronima u RVLM-u (**Slika 7**). Premotorni neuroni RVLM-a su tonično aktivni, pa su ključni za održanje simpatičkog vazomotornog tonusa i arterijskog pritiska u mirovanju [24,132,163,167].



Slika 7. Neuronski putevi BRR-a. RVLM – rostralna ventrolateralna medula; NTS – *nucleus tractus solitarius*; CVLM – kaudoventrolateralna medula; IML – intermediolateralno jedro sive mase kičmene moždine. Slika preuzeta i modifikovana sa <https://www.innerbody.com/image/nerv02.html>.

Kada dođe do pada pritiska, smanjuje se stopa akcionih potencijala, koja baroreceptorskim aferentnim vlaknima stiže do NTS-a. Samim tim snižava se i ekscitacija NA i CVLM-a, što vodi umanjenju vagalnog uticaja na srce. Takođe, ukida se inhibicija nametnuta simpatičkim premotornim neuronima u RVLM-u, pa se povećava simpatički uticaj na srce i krvne sudove (**Slika 8**) [163,168]. Smatra se da refleksno povećanje perifernog otpora preuzima veći udeo (80%) u očuvanje pritiska u odnosu na minutni volumen srca [168].



Slika 8. Mehanizam refleksnog povećanja simpatičke aktivnosti usled pada BP-a. Slika preuzeta i modifikovana iz Dampney i saradnici, 2016 [163].

Osim što vazopresin menja aktivnost BRR-a [114], pokazano je da aferentni impulsi koji polaze od baroreceptora u luku aorte i karotidnom sinusu tonično inhibiraju sekreciju VP-a

[169]. Efekti na MCN su indirektni i prvo se obrađuju u NTS-u i i ventrolateralnoj meduli (VLM), pre nego što stignu do PVN-a [65]. Aferenta inervacija koja polazi od NTS-a i VLM-a ka MCN je dominantno noradrenergička (A1 i A2 neuroni). Pretpostavlja se da baroreceptorska vlakna aktiviraju GABA neurone u NTS-u, koji inervišu noradrenergičke projekcije ka PVN-u i na taj način inhibiraju ekscitaciju MCN-a [137,169,170].

Takođe, neuroni PVN-a koji se projektuju do RVLM-a i IML-a su barosenzitivni, jer su spontano aktivni, a blokirani su povećanjem pritiska [122]. Osim toga, potvrđena je baroreceptorska gabaerگیčka inhibicija renalnih simpatoekscitatornih neurona u PVN-u [171]. Aksoni koji polaze iz kaudalnog dela NTS-a završavaju se na PCN i regionu dorzalne kape PVN-a. Pretpostavlja se da su tačna mesta terminacije ovih projekcija parvocelularni presimpatetički neuroni ili GABA interneuroni [60].

1.5.4.3. Promena aktivnosti paraventricularnog jedra usled dejstva stresora

Stres je priznati faktor rizika za razvoj hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti [172,173]. Učešće PVN-a u hipertenziji indukovanoj stresom potvrđeno je na SHR-ovima [59]. PVN ima važnu ulogu u neuroendokrinom odgovoru na stres, utičući na nekoliko aspekata kardiovaskularne kontrole [59,174]. Takođe, stres je snažan stimulator vazopresinergičkog sistema u mozgu i menja signalizaciju u okviru njega, što osim uticaja na odgovor HPA ose, za posledicu ima i promene u ponašanju [175,176].

Važnu ulogu u aktivaciji HPA ose na stres imaju PCN PVN-a, koji sintetišu CRH [116,177]. Pokazano je da sadržaj VP-a u ovim neuronima raste u stanjima hipersenzitivnosti HPA ose, kao što je hronični stres, dok nivo CRH ostaje nepromenjen [117,178,179]. Odnos CRH i VP je važan u održavanju sekretornog kapaciteta kortikotropnih ćelija [118]. Dakle, značaj VP-a u odgovoru na stres nekada može biti veći od uloge CRH i odgovor PVN-a se prilagođava zasebno za svaki tip stresora [56].

Interpretacija prirode stresora odigrava se u višim centrima u mozgu, što za posledicu može imati aktivaciju ili inhibiciju PVN-a. CRH parvocelularni neuroni podložni su različitim direktnim i indirektnim uticajima koji modulišu njihovu funkciju [180]. Informacije o emocionalnom odgovoru na spoljne stresore polaze iz prefrontalnog korteksa i amigdale i lateralnog septuma i stižu do subkortikalnog limbičkog jedra (engl. *bed nucleus of the stria terminalis* – BNST) i DMV, koji zatim šalju projekcije do PVN-a. Ovi putevi su prevashodno gabaerگیčki [170,181]. Osim toga, CRH pozitivni PCN primaju i noradrenergičke ekscitatorne stimuluse iz unutrašnjeg dela moždanog stabla (lat. *locus coeruleus*) [182]. Ipak, glavni ekscitatorni stimulus usmeren na CRH neurone u odgovoru na stres je onaj koji potiče od A1/A2 grupe neurona iz CVLM-a i NTS-a [183,184].

S druge strane, interoceptivni ili sistemski stresori menjaju aktivnost PVN-a preko vagalnih uticaja na NTS ili preko A1/C1 kateholaminergičke grupe neurona u VLM-u. Ove projekcije stižu do svih regiona PVN-a [181].

Osim toga VP izgleda igra ulogu u adaptaciji na stres kao neurotransmitter/neuromodulator [175,185]. Kada se oslobodi unutar samog jedra u odgovoru na stres, VP blokira aktivnost HPA ose indukovane stresom i ima negativan tonus na sekreciju ACTH [185–187]. Pokazano je da je emocionalni stres snažan stimulator oslobađanja intranuklearnog VP-a [186]. Takođe, studije ukazuju da VP oslobođen unutar PVN-a igra ulogu i u promeni ponašanja u odgovoru na stres [188,189]. Dakle, dugoročna i snažna stimulacija neuropeptidgerگیčkih kola VP-a i CRH-a, osim što obezbeđuje fiziološku i bihevioralnu adaptaciju na stres, povećava i podložnost za razvoj patofizioloških stanja [96].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja bili su:

1. Određivanje ekspresije gena za VP, V1aR i V1bR u PVN-u, koncentracije VP-a u plazmi i kardiovaskularnih parametara kod BHR-ova i normotenzivnih *Wistar* pacova pod bazalnim uslovima.

2. Određivanje ekspresije gena za VP, V1aR i V1bR u PVN-u, koncentracije VP-a u plazmi i kardiovaskularnih parametara kod BHR-ova koji su bili pod opterećenjem solju sa i bez primene heterotipičnog ponovljenog stresa.

3. Određivanje veze između ekspresije gena za VP, V1aR i V1bR u PVN-u, koncentracije VP-a u plazmi i nastanka hipertenzije indukovane opterećenjem BHR-ova solju i njihovim izlaganjem heterotipičnom ponovljenom stresu.

3. MATERIJAL I METODE

Sve eksperimentalne procedure izvedene su u saglasnosti sa Direktivom 2010/63/EU Evropskog parlamenta za zaštitu životinja koje se koriste u naučne svrhe, kao i Aktom o dobrobiti životinja 2009/6/RS i Pravilnikom 2010/RS. Izvođenje eksperimenata je u skladu sa preporukama dobre laboratorijske prakse o etičkom radu sa oglednim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i odobreno je od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu (broj rešenja: 323-07-04083/2016-05/7).

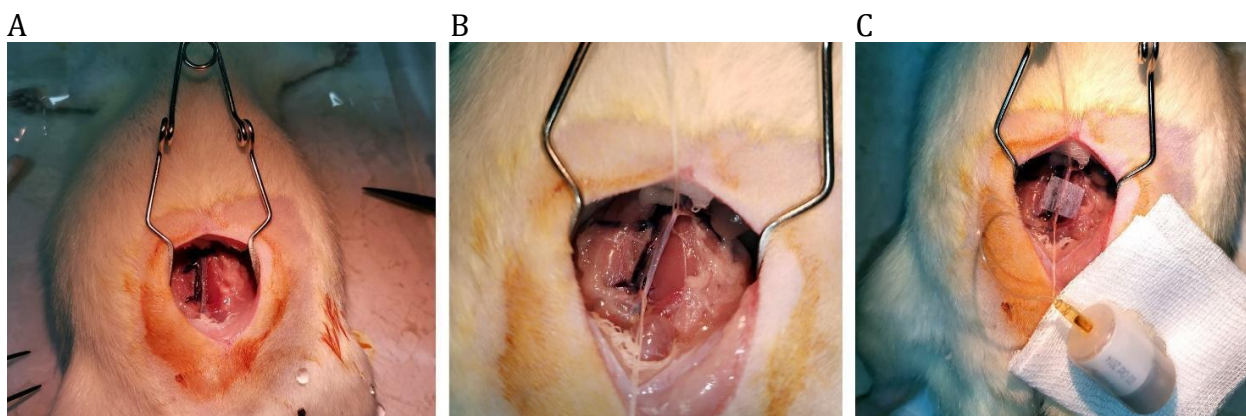
3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Za potrebe ovog istraživanja korišćena su dva soja pacova uzgojenih u vivarijumu Medicinskog fakulteta: normotenzivni mužjaci *Wistar* pacova (engl. *Wistar rats* – WR) nesrodničkog (*outbreed*) soja i mužijaci BHR soja pacova. Kriterijumi za uključivanje pacova u studiju bili su starost životinja (12 nedelja starosti) i telesna masa (280-330 g). Tokom trajanja eksperimentalnog protokola životinje su držane u kontrolisanim uslovima spoljašnje sredine (12 h/12 h ciklus svetlost-tama; temperatura: 21 ± 2 °C i relativna vlažnost vazduha: $65\% \pm 9$) sa slobodnim pristupom briketiranoj hrani (0.2% sadržaj natrijuma; Veterinarski zavod, Subotica, Republika Srbija) i pijaćoj vodi ili 0.9% rastvoru natrijum-hlorida (NaCl). Proračun veličine uzorka (N) za svaku eksperimentalnu grupu dobijen je korišćenjem *Power Sample Size Calculation* softvera (<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>) za grešku I tipa sa snagom od 90% i verovatnoćom od 0.05.

3.2. HIRUŠKA PROCEDURA IMPLANTACIJE RADIOTELEMETRIJSKOG TRANSMITERA U ABDOMINALNU AORTU

Životinje su operisane pod balansiranom opštom anestezijom ketaminom (Ketamidol, № A99325611, *Richter Pharma AG*, Austrija) (100 mg/kg, i.m.) i ksilazinom (Xylased, № 1155920A, *Bioveta*, Češka) (10 mg/kg, i.m.), a dubina anestezije je proveravana odsustvom kornealnog i pedalnog refleksa na početku i tokom operacije. Nakon potpunog uklanjanja dlaka u abdominalnoj regiji i pripreme hiruškog polja jodom, životinje su stavljane u leđni položaj uz fiksaciju ekstremiteta, na ploču od pleksiglasa, ispod koje se nalazila grejna podloška (*Harvard Apparatus*, *Holliston*, MA, SAD) za održavanje telesne temperature. U predelu središnjeg dela abdomena, napravljen je rez dužine 3 cm, a creva su retrahovana i vezivno tkivo abdomena preparisano do uočavanja donje šuplje vene (lat. *vena cava inferior*), aorte i splanhičnog nerva (lat. *nervus splanchnicus*) (**Slika 9A**). Iznad nivoa renalne i ilijačne arterije napravljene su privremene okluzije na trbušnoj aorti, kako bi se usporio krvotok i olakšalo ubacivanje katetera radiotelemetrijskog transmitera (**Slika 9B**). Vrh katetera radiotelemetrijskog uređaja (TA11-PA C40; *DSI*, *Transoma Medical*, *St. Paul*, SAD) ubačen je u abdominalnu aortu uz pomoć vođice (igla 21G) i fiksiran tkivnim lepkom (3M *Vetbond*TM, 3M, SAD) i tkivnim papirom od celuloze (*DSI*, *Transoma Medical*, *St. Paul*, SAD) (**Slika 9C**). Telo radiotelemetrijskog uređaja je pričvršćeno za prednji zid abdomena, a rez zatvoren čvorastim šavovima. Životinje su perioperativno tretirane gentamicinom (№ J01GBO, *Hemofarm*, Vršac, Republika Srbija) (25 mg/kg, i.m.), da bi se sprečila sekundarna bakterijska infekcija i karprofenom (*Rimadyl*®, № 104RI009AE, *Phizer Ltd.*, Velika Britanija) (5 mg/kg, s.c.), kako bi se smanjio bol. Nakon operacije, pacovi su smeštani u pojedinačne kaveze od pleksiglasa (30 ×

30 × 30 cm) pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima i praćeni su svakodnevno do postizanja potpunog oporavka.



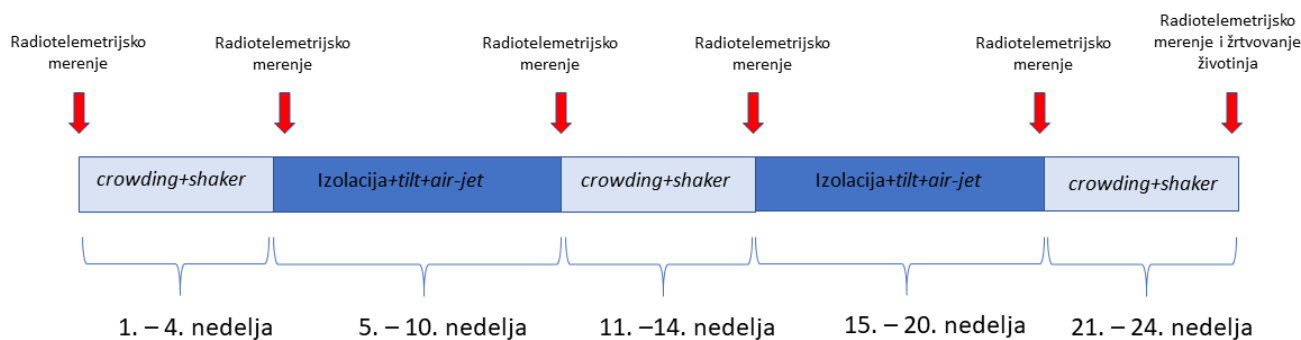
Slika 9. Koraci u implantaciji radiotelemetrijskog transmitera u trbušnu aortu pacova. A – preparisanje vezinog tkiva i retrakcija creva; B – okluzija abdominalne aorte; C – ubacivanje katetetera radiotelemetrijskog transmitera i njegova fikasacija.

3.3. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Četrnaest dana od hiruške intervencije životinje su razvrstane u četiri grupe i BHR-ovi su metodom slučajnog izbora podvrgnuti različitim protokolima: **grupa I** – WR koji su pili vodu i držani pod bazalnim uslovima tokom 24 nedelje (N=6) ; **grupa II** – BHR-ovi koji su pili vodu i držani pod bazalnim uslovima tokom 24 nedelje (N=8); **grupa III** – BHR-ovi koji su bili pod blagim opterećenjem solju (pili su 0.9% rastvor NaCl) tokom 24 nedelje (N=8) [190,191]; **grupa IV** – BHR-ovi koji su bili pod blagim opterećenjem solju (pili su 0.9% rastvor NaCl) i istovremeno su izlagani ponovljenom heterotipičnom stresu tokom 24 nedelje (N=9). Heterotipični ponovljeni stres je primenjivan u dva smenjujuća bloka, u različito vreme u toku dana, kako bi se smanjila adaptacija životinja na stres:

- Prvi blok je trajao četiri nedelje i obuhvatao je dva modela stresa: šest dana u nedelji životinje su držane na smanjenom životnom prostoru (engl. *crowding*; 70 cm²/100 g telesne mase) i bile izlagane platformi koja podrhtava (engl. *shaking*; 200 obrtaja/min 30 min) [191–193].
- Drugi blok je trajao šest nedelja i obuhvatao je tri modela stresa: šest dana u nedelji pacovi su držani u izolaciji u neprozirnim kavezima od pleksiglasa (200 cm²/100 g telesne mase), pod nagibom od 40° u trajanju od 60 min (engl. *tilt*) i izlagani toku vazduha pod pritiskom (1bar) usmerenom u teme pacova u trajanju od 2 min (engl. *air-jat*) [191,194–196].

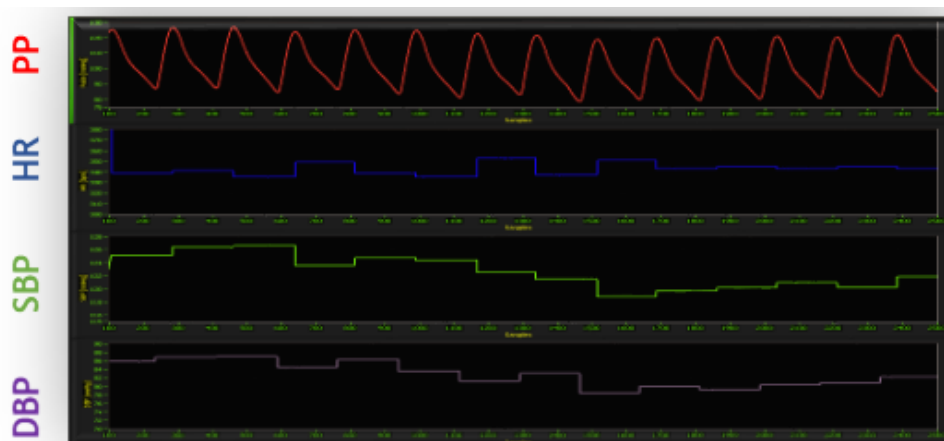
Prvi blok je ponovljen tri puta, dok je drugi blok ponovljen dva puta u toku trajanja studije, što u zbiru daje dužinu protokola od 24 nedelje (**Slika 10**). Svakog sedmog dana (dan kada nije primenjivan stres) beleženi su hemodinamski (SBP, DBP, HR) i spektralni parametri, kao i funkcionisanje BRR-a. Prikazani su samo podaci dobijeni na kraju svakog bloka stresa. Za hemodinamska merenja u grupu I uključeno je 6 životinja, u grupu II 7, u grupu III 8, a u grupu IV 9 pacova. Pojedine životinje su isključene iz navedenog tipa analiza, usled pražnjenja baterije radiotelemetrijskog transmitera.



Slika10. Šematski prikaz protokola heterotipičnog ponovljenog stresa.

3.4. REGISTRACIJA I ANALIZA SIGNALA ARTERIJSKOG KRVNOG PRITISKA

Sa radiotelemetrijskog uređaja, signal arterijskog BP-a se prenosi do računara opremljenog softverom *Dataquest A.R.T.4.0.* (DSI, *Transoma Medical, St. Paul, SAD*) specijalizovanim za prikupljanje i obradu kardiovaskularnih signala. Vrednost arterijskog pulsog pritiska (PP) je digitalizovana na 1000 Hz, a zatim podsemplovana na 20 Hz. SBP, DBP i pulsni interval (PI) tj. njegova inverzna vrednost srčana frekvencija (engl. *heart rate – HR*), izvedeni su iz talasa arterijskog pulsog pritiska kao maksimum, minimum, rastojanje između dva maksimuma i $60/PI$, redom (**Slika 11**). Ove komponente raščlanjenog pulsog pritiska učitavane su u *BP Complete software v 8.0.0.*, razvijen u laboratoriji prof. dr Nine Žigon za potrebe primene spektralne analize i metode sekvenci. Pre samih analiza, vizuelno su identifikovani artefakti i manuelno uklonjeni.



Slika 11. Digitalni zapis arterijskog pulsog pritiska (PP) i njegove komponente. SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija.

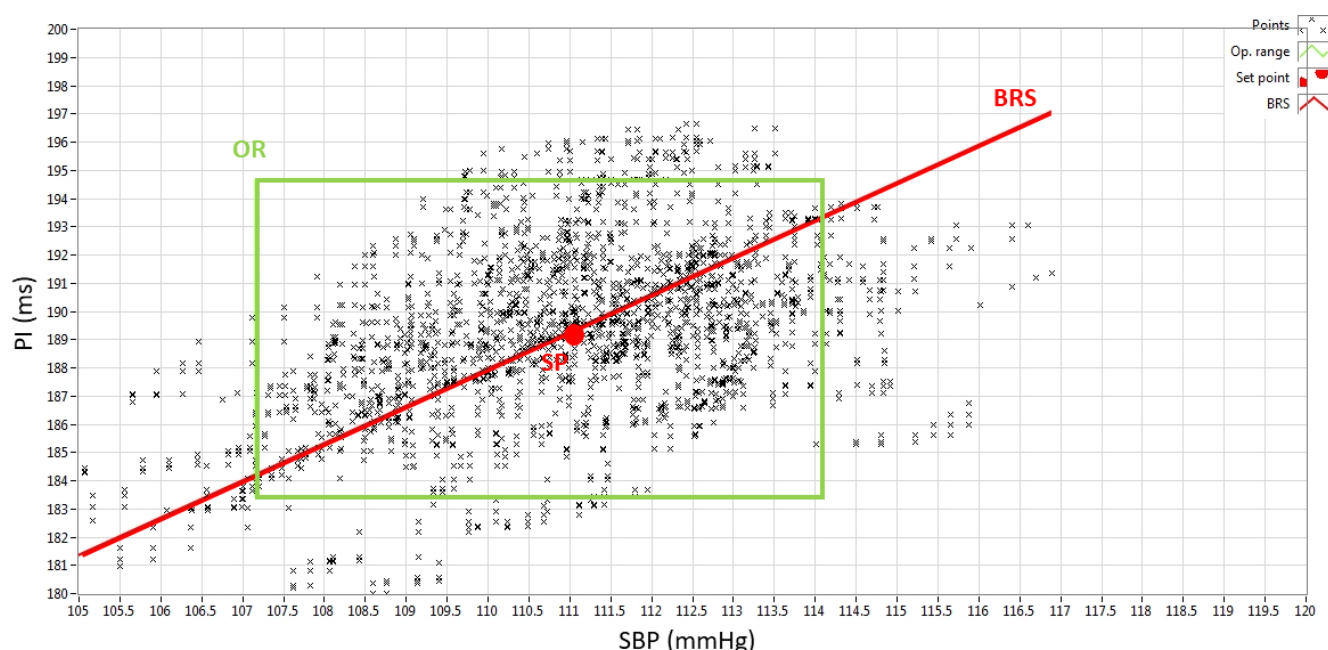
3.4.1. METODA SEKVENCI BARORECEPTORSKOG REFLEKSA

Prvi korak u analizi BRR-a metodom sekvenci podrazumeva kompjutersku pretragu vremenskih serija SBP-a i PI i identifikaciju uzastopnih otkucaja pri kojima se SBP i PI menjaju u istom smeru (rast/pad). Za analizu se koristi PI umesto HR-a, jer je odnos između frekvencije vagalne stimulacije i intervalnih PI odgovora linearan, dok bi za HR bio hiperbola. Takođe, radi povećanja osetljivosti metode sekvenci, koriste se filteri za niske frekvencije koji eliminišu promene neautonomnog porekla izazvane respiracijom. Refleksni odgovor BRR-a u vidu PI

kasni za detektovanom promenom SBP-a 3-5 otkucaja [197–199]. Za opisivanje promena BRR-a uvedeni su sledeći parametri, koji su računati na signalu SBP i PI dužine 410 s:

- Senzitivnost baroreceptorskog refleksa (engl. *baroreceptor reflex sensitivity* – BRS, ms/mmHg) je računata kao srednji linearni regresioni koeficijent svih sekvenci ($PI = BRS \times SBP + const.$, gde je prilagođavanje krive urađeno metodom najmanjih kvadrata);
- Indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa (engl. *baroreceptor effectiveness index* – BEI) je odnos broja SBP-PI sekvenci prema broju SBP rampi (najmanje 3 uzastopna porasta sistolnog krvnog pritiska);
- Opseg delovanja baroreceptorskog refleksa (engl. *operating range* – OR) je pravougaona površina SBP-PI ravni koja obuhvata 95% svih vrednosti između najviših i najnižih tačaka sekvenci (mmHg x ms);
- Težište rada baroreceptorskog refleksa (engl. *set point* – SP) je medijana svih SBP-PI parova

(Slika 12).



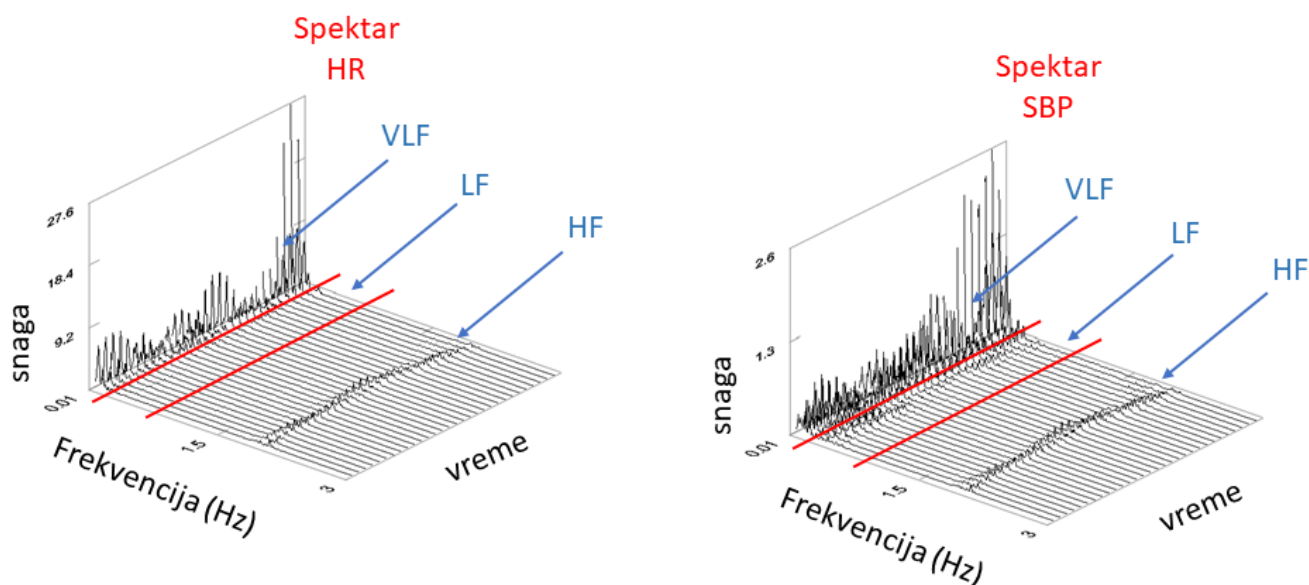
Slika 12. Grafički prikaz parametara koji opisuju promene BRR-a. PI – pulsni interval; SBP – sistolni krvni pritisak; BRS – senzitivnost BRR-a; OR – opseg delovanja BRR; SP – težište rada BRR-a.

3.4.2. SPEKTRALNA ANALIZA I KARDIOVASKULARNI VARIJABILITET

Pre primene spektralne analize ekvidistantno registrovani i podsemplovani SBP, DBP i HR provučeni su kroz *Hanning*-ove filtere od 9 tačaka radi delinearizacije, što je omogućilo primenu direktne spektralne analize. Jedan spektar dobijen je korišćenjem algoritama brze *Fourier*-ove transformacije (engl. *fast Fourier transformation* – FFT) na vremenskim nizovima BP-a i HR-a u 2048 tačaka i sa *Nyquist*-ovom frekvencijom od 10 Hz. Spektar kroz vreme (tFFT) dobijen je zbrajanjem 30 pojedinačnih preklopljenih spektara sa fiksnim vremenskim pomerajem od 211 tačaka (10.55 s) na signalu koji je obuhvatao 8192 tačke (406.6 s registracije).

Analiza spektra vršena je do 3 Hz. Zbir modula harmonika ispod volumena 30 pojedinačnih spektara računat je za ceo spektar (engl. *total volume*, $TV=0.00976-3Hz$) i u tri

frekvencijalne zone: zoni veoma niskih frekvencija (engl. *very low frequency*, VLF=0.00976-0.195), niskih frekvencija (engl. *low frequency*, LF=0.195-0.8 Hz) i visokih frekvencija (engl. *high frequency*, HF=0.8-3 Hz) (Slika 13).



Slika 13. Grafički prikaz spektrara HR-a i BP-a kroz vreme. VLF – zona veoma niskih frekvencija, LF – zona niskih frekvencija, HF – zona visokih frekvencija.

VLF BP oscilacije nastaju usled dejstva vazoaktivnih mehanizama, pre svega renin-angiotenzin sistema (RAS), dok je VLF HR verovatno posledica termoregulacije. LF BP je posledica delovanja simpatičkog nervnog sistema i aktivnosti BRR-a na srce i krvne sudove, dok je LF HR odraz simpatovagalnog upliva na srce. HF BP nastaje usled mehaničkih efekata respiracije, dok je HF HR posledica uticaja vagusa. U kliničkoj i eksperimentalnoj praksi LF BP i LF/HF HR indeks istakli su se kao autonomni markeri simpatičke modulacije perifernog otpora i simpatovagalnog balansa na srce [200–202].

3.5. UZORKOVANJE KRV I MOŽDANOG TKIVA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VAZOPRESINA U KRVNOJ PLAZMI I EKSPRESIJE iRNK ZA VAZOPRESIN I NJEGOVE RECEPTORE U PARAVENTRIKULARNOM JEDRU PACOVA

Po završetku eksperimentalnog protokola, životinje su žrtvovane giljotinom (*Harvard Apparatus, Holliston, MA, SAD*), metodom brze dekapitacije. Krv iz dekapitovanog tela životinja prikupljena je u ohlađene epruvetice sa heparinom radi određivanja koncentracije VP-a u plazmi. Mozgovi pacova su nakon vađenja brzo zamrzavani na praškastom suvom ledu. Tkiva su čuvana na -80°C najviše 6 meseci, koliko je bilo neophodno da se prikupe uzorci svih grupa.

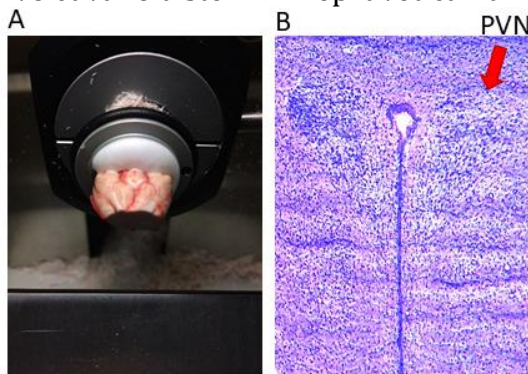
3.5.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VAZOPRESINA U PLAZMI

Krvna plazma dobijena je centrifugiranjem (20 min, $1600 \times g$ na 4°C). Po kompletiranju grupnih uzoraka, zamrznuta krvna plazma je transportovana na suvom ledu (-80°C) do Univerziteta u Bristolu, gde je izvršena ekstrakcija VP-a i liofilizacija. Za ekstrakciju VP-a uzeto je 0,7 ml plazme koja je pomešana sa 2 ml ohlađenog acetona (№ 650501, *Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*) u epruveti od 5 ml na automatskoj mešalici tokom 1 min. Zatim je smeša

centrifugirana na 2500 rpm na 4 °C 25 min. Supernatan je prebačen u nove epruvete od 5 ml i pomešan sa 2 ml ohlađenog etra nafte (№ 8032-32-4, *Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*), a potom je smeša promešana na automatskoj mešalici 1 min, nakon čega je stajala na sobnoj temperaturi još 1 min. Pipetom je uklonjen gornji prozirni sloj, a zatim izvršena liofilizacija u vakuumu na 1000 rpm tokom 1h 15 min na 4 °C. U takvom stanju, liofilizovani uzorci su čuvani na -20 °C do 6 meseci. Određivanje koncentracije VP-a obavljeno je na Univerzitetu u Sao Paulu metodom radioimunoeseja (engl. *radioimmunoassay* – RIA). RIA metoda meri antigen-antitelo reakcije, što omogućava precizno određivanje uzorka nepoznate koncentracije, gde obeleženi reagens obezbeđuje kvantifikaciju neobeležene reagensa iz uzorka. Sintetički standard za VP (№ V9879, *Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*) korišćen je za konstruisanje standardne krive za RIA i za pripremu obeležene hormona (*tracer*). Primarno antitelo za VP koje je korišćeno u RIA metodi proizvedeno je od strane *Peninsula* (№ T4561, San Karlos, SAD). Radioaktivni jod (¹²⁵I) je kupljen od *Perkin Elmer* (Boston, MA, SAD), a sekundarno antitelo za precipitaciju formiranog kompleksa je proizvedeno u Laboratoriji za Neuroedokrinologiju, na Univerzitetu u Sao Paulu, injekcijom gama globulina zeca (№ G-0261, *Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*) u kozu. Izolovanje i merenje VP-a u duplikatu obavljeno je korišćenjem specifične RIA tehnike, opisane od strane *Husain* i saradnika [203]. Osetljivost RIA metode varirala je od 0,4 to 32,0 pg/ml, sa unutaresejskim i međusesejskim koeficijentom varijacije 7,9–9,75%.

3.5.2. UZORKOVANJE TKIVA PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

Duboko zamrznuti mozgovci pacova su temperirani na -18 °C unutar kriostata (*Leica Microsystems CM1900, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Nussloch, Nemačka*), nakon čega su presecani u nivou bregme i fiksirani na podlošci za sečenje tkivnim matriksom (*Bio-Optica, Italija*) (**Slika 14A**). Korišćenjem kriostata, pravljene su isečci debljine 60 µm u rostro-kaudalno pravcu, koji su zatim bojeni toluidin plavim (1% u 70% etanola, *Sigma-Aldrich Co. Ltd, Poole, Dorset, Velika Britanija*) radi mapiranja i verifikaciju hipotalamusa (**Slika 14B**) [204]. Uzorkovanje levog i desnog PVN-a (dijametra 1 mm tkiva) vršeno je iz neobojenih isečaka iglicom za uzorkovanje tkiva od 15 G (15-G Sample Corer, № 18035-01, *Fine Science Tools Inc., Foster City, SAD*), a zatim je tkivo čuvano u sterilnim epruveticama na -80°C.



Slika 14. Uzorkovanje tkiva PVN-a. A – fiksiranje mozga na kriostatu; B – izgled PVN-a obojenog toluidin plavim.

3.5.3. MOLEKULARNO BIOLOŠKE ANALIZE TKIVA PARAVENTRIKULARNOG JEDRA

3.5.3.1. Ekstrakcija ukupne RNK

Uzorci tkiva PVN-a su homogenizovani u 1 ml *TRIzol* reagensu (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD*) kratkotrajnim mešanjem na automatskoj mešalici (*BioSan, Riga,*

Letonija), a potom držani na sobnoj temperaturi 5 min. Epruvetice sa uzorcima su centrifugirane (*Labnet International, Inc., New Jersey, SAD*) na 12000 rpm 12 min na 4 °C. Supernatanti su aspirirani automatskom pipetom i odliveni u nove sterilne epruvetice, dok je talog koji sadrži ćelijski debris odbačen sa starim epruveticama. Ekstrakciji RNK prethodilo je dodavanje 200 µl hloroforma (*Sigma-Aldrich Co. Ltd, Taufkirchen, Nemačka*), praćeno mešanjem uzoraka na automatskoj mešalici i njihovim stajanjem 3 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je usledilo centrifugiranje od 15 min na 12 000 rpm na 4 °C. Gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK je prebačena u nove epruvetice. Ovaj postupak se vršio bez narušavanja interfaze sa DNK i donje organske faze sa proteinima. Ukupna RNK iz vodene faze je rastvorena jednim volumenom (~350 µl) etanola (EtOH 100% v/v, *Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Republika Srbija*) i izolovana korišćenjem *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen, Qiagen Ltd, Manchester, Velika Britanija*). Celokupna smeša je prebačena na *RNeasy Mini* kolonice sa membranom (**Slika 15**), koje su stajale u epruveticama za prikupljanje od 2ml. *RNeasy Mini* kolonice su zatim centrifugirane na sobnoj temperaturi na 9600 rpm 15 s. Odbačena je eluirana tečnost sa nečistoćama, dok se RNK zadržala na membrani kolonice. Nakon toga svaka kolonica je nalivena sa 700 µl RW1 pufera i centrifugirana na sobnoj temperaturi na 9600 rpm tokom 15 s. Eluirana tečnost je odbačena, a kolonica naliven sa 500 µl RPE pufera i centrifugirana na sobnoj temperaturi na 9600 rpm tokom 15 s, a zatim eluirana tečnost odbačena. Ovaj postupak je ponovljen tri puta. Kolonice su potom prebačene u nove epruvetice za prikupljanje i centrifugirane na sobnoj temperaturi na 13500 rpm tokom 1 min, da se ukloni višak tečnosti. Kolonice sa membranom su potom prebačene u nove sterilne epruvetice za prikupljanje od 1,5 ml i ostavljene otvorene u laminaru da se suše 10 min. Nakon toga kolonice su nalivene sa 30 µl vode oslobođene od RNKaza i centrifugirane na sobnoj temperaturi na 9600 rpm tokom 1 min. Eluirana voda je prikupljena i ponovo nalivena na membrane kolonice i ceo postupak centrifugiranja je ponovljen. Nakon toga odbačene su kolonice sa membranom, a uzorak sa RNK je ostao u epruveticama za prikupljanje. Radi provere kvaliteta i određivanja koncentracije ukupne RNK, za svaki uzorak je očitana apsorbancija na 360 nm pomoću *BioSpec-nano* aparata (*Shimadzu, Kyoto, Japan*).



Slika 15. *RNeasy Mini* kolonice sa membranom za izolaciju RNK

3.5.3.2. Sinteza cDNK

Sinteza komplementarne (engl. *complementary*) dezoksiribonukleinske kiseline (cDNK) je obavljena korišćenjem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (*Qiagen, Qiagen Ltd., Manchester, Velika Britanija*). Reakcija za eliminaciju genomske DNK sadržala je za svaki uzorak 2 µl *gDNA Wipeout Buffer-a*, uzorak RNK i vodu oslobođenu od RNKaza (volumeni su prilagođeni tako da ukupna zapremina reakcije bude 14 µl sa ulaznom koncentracijom RNK od 100 ng). Nakon toga

smeša sa mustrom za cDNK sintezu je inkubirana u termobloku (*BioSan*, Riga, Letonija) na 42 °C 2 min, a potom prebačena na led. Smeša za reverznu transkripciju sadžala je 1 µl reverzne transkriptaze (*Quantiscript Reverse Transcriptase*), 1 µl smeše prajmera za reverznu transkripciju (*RT Primer Mix*) i 4 µl pufera za reverznu transkripciju (*Quantiscript RT Buffer*) po uzorku. Ove dve smeše su objedinjene u jedinstvenu reakcionu smešu ukupne zapremine 20 µl po uzorku, koja je potom inkubirana 30 min na 42 °C. Nakon toga, reakcija reverzne transkripcije je prekinuta inkubacijom reakcione smeše na 95 °C, kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza. Zatim su tube sa nosintetisanim cDNK uzorcima prebačene na led i čuvane -20 °C. Uzorci cDNK su razblaženi do najmanje koncentracije dovoljne za reakciju lančane polimerizacije u realnom vremenu (engl. *real time quantitative polymerase chain reaction* – RT-qPCR).

3.5.3.3. Reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu (RT-qPCR) i analiza podataka

RT-qPCR je obavljen na *Applied Biosystems Vii7 Real-Time PCR* aparatu (*Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD*) (**Slika 16**) koji je zasnovan na lančanoj reakciji polimerizacije sa fluorescencijom.



Slika 16. *Applied Biosystems Vii7 Real-Time PCR* aparat

Upravo ova fluorescencija omogućava detektovanje koncentracije uzorka u realnom vremenu (apsolutna kvantifikacija), ali i promenu ekspresije između uzoraka (relativna kvantifikacija). U ovim eksperimentima je kao fluorescentna boja korišćen *SYBR Green* (*Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija*), koja se nespecifično vezuje za dvolančanu DNK, a intezitet fluorescencije je direktno proporcionalan količini uzorka.

Uzorci sa cDNK su nalivani u triplikatu na mikroploče sa 96 raspoloživih bunara (*Applied Biosystems, Foster City, SAD*) u 12 µl zapremine rastvora koji je sadržao: 2 µl cDNK uzorka; 0.048 µl/100 nM prajmera x 2; 3,904 µl vode oslobođene od RNKaza i 6 µl *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija*), koji predstavlja mešavinu termostabilne DNK polimeraze, nukleotida (dNTPs), pufera i *SYBR green* boje. Mikroploče su prekrivene zaštitnom folijom (*Foster City, CA, Velika Britanija*), a zatim su uzorci centrifugirani 30s na 2500 rpm na *Mini plate spinner* uređaju (*Labnet International, Inc., New Jersey, SAD*), kako bi se uklonili mehurići vazduha. Temperaturni protokol reakcije lančanog umnožavanja DNK obuhvatao je: denaturaciju cDNK (50 °C – 2min, 95 °C – 10min), 40 ciklusa umnožavanja cDNK

(95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min) i terminaciju reakcije (95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min, 95 °C – 15 s). Analiza podataka je obavljena korišćenjem *ViiA 7 v1.1* softvera (*Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD*), a relativna genska ekspresija je određena metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [205].

Svi prajmeri osim onog za V1aR, dizajnirani su korišćenjem *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) baze podataka. Kao endogena kontrola (engl. *housekeeping gene*), korišćen je gen za ribozomalni protein L19 (engl. *ribosomal protein L19 – RPL19*), čiji je prajmer proizveden od strane *Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Nemačka)* i imao je sledeću sekvencu: 5'-GCGTCTGCAGCCATGAGTA-3' i 5'-TGGCATTGGCGATTTCGTTG-3; *GeneBank* referentna sekvenca: NC_005109.4. S obzirom da je konstitutivno eskprimiran, ekspresija RPL19 je upotrebljen za normalizaciju ekspresije VP-a i njegovih receptora između uzoraka. Drugi prajmeri za gene pacova korišćeni u ovoj studiji su prajmeri za VP (5'-TGCCTGCTACTTCCAGAACTGC-3' i 5'-AGGGGAGACACTGTCTCAGCTC-3'; *GeneBank* referentna sekvenca: NM_016992.2) sintetisan od strane *Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Nemačka)*, V1aR (Rn Avpr1a 1 SG *QuantiTect Primer Assay, QT00402990, GeneBank* referentna sekvenca: NM_053019.2), komercijalno nabavljen od *Qiagen-a (Qiagen Ltd, Manchester, Velika Britanija)*, i V1bR (5'-TGCCACATTCTGGAGTACCT-3', 5'-AGGACGGTTAACCAAGTAGTGAGATG-3'; *GeneBank* referentna sekvenca: NM_017205.3) kupljen od *Invitrogen-a (Karldbad, Kalifornija, SAD)*.

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani grafički i tabelarno kao srednja vrednost \pm standardna greška (s.e.m.). Relativna ekspresija gena za sve grupe dobijena RT-qPCR, poređena je *One-way ANOVA* statističkim testom, praćenim *Tukey post hoc* testom (*SPSS Statistics v.20* softver; *IBM Corporation, New York, SAD*). Studentov t-test korišćen je da se utvrde razlike u BP-u, HR-u, spektralnim parametrima i funkciji BRR-a između WR i BHR-ova koji su držani pod bazalnim uslovima. Ovaj test sproveden je u okviru softverskog paketa *SPSS Statistics v.20*. Hemodinamski podaci, spektralni parametri i funkcija BRR-a koji su praćeni tokom 24 nedelje protokola podvrgnuti su testiranju testom ANOVA ponovljenih merenja unutar svake eksperimentalne grupe u okviru *SPSS Statistics v.20* softveru. Hijerarhijska linearna regresija (*mixed-effect regression model*) upotrebljena je za poređenje prethodno navedenih parametara između različitih eksperimentalnih grupa tokom vremena u *R-3.5.0* softveru (*The R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija*). Statističkom značajnošću smatrana je vrednost $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. HEMODINAMSKI PARAMETRI, FUNKCIJA BARORECEPTORSKOG REFLEKSA I KARDIOVASKULARNI KRATKOTRAJNI VARIJABILITET KOD WISTAR PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

4.1.1. HEMODINAMSKI PARAMETRI KOD WISTAR I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA

BHR-ovi pod bazalnim uslovima imali su više vrednosti SBP-a u odnosu na WR pod istim uslovima. Takođe, osim većih vrednosti SBP-a i DBP je bio viši kod BHR-ova pod bazalnim uslovima. Međutim ova grupa imala je niže vrednosti HR-a u odnosu na WR pod bazalnim uslovima (**Tabela 1**).

Tabela.1 Hemodinamski parametri kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima

	grupa I	grupa II
SBP (mmHg)	115 ± 3	134 ± 3 **
DBP (mmHg)	82 ± 2	99 ± 2 **
HR (bpm)	321 ± 12	269 ± 6 ***

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja ± s.e.m.. Uočen je porast SBP-a i DBP-a i pad HR-a u grupi II, u poređenju sa grupom I. SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. WR pod bazalnim uslovima (Studentov t-test).

4.1.2. FUNKCIJA BARORECEPTORSKOG REFLEKSA KOD WISTAR I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA

Ispitivanjem funkcije BRR-a metodom sekvenci uočeno je povećanje njegove senzitivnosti (BRS) u grupi II, u poređenju sa grupom I. Pored toga pod bazalnim uslovima nije došlo do statistički značajne promene BEI kod WR i BHR soja pacova. Zatim, OR i SP su bili pomereni ka višim vrednostima kod BHR-ova pod bazalnim uslovima, što ukazuje na povećanje opsega delovanja BRR-a, ali i na resetovanje njegove funkcije ka višim vrednostima pritiska (**Tabela 2**).

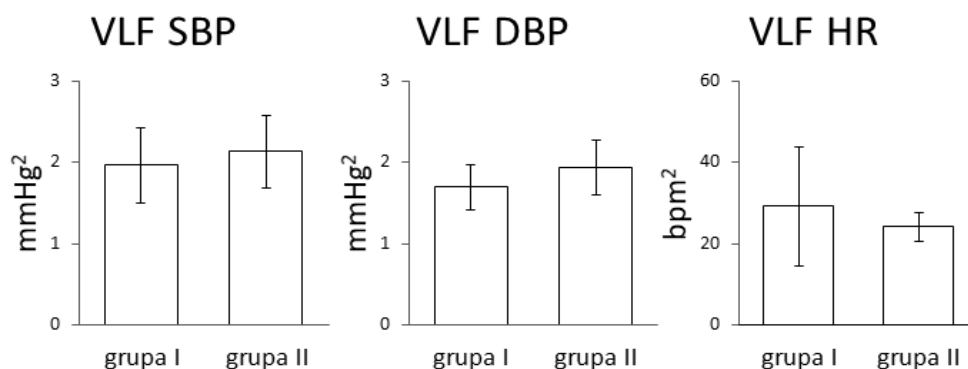
Tabela.2 Parametri funkcije BRR-a kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima

	grupa I	grupa II
BRS (ms/mmHg)	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2*
BEI	0,6 ± 0,03	0,63 ± 0,02
OR (ms x mmHg)	114,6 ± 36,5	205 ± 2,0 *
SP (mmHg)	105,1± 3.2	123,6±3,2**

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja ± s.e.m.. Životinje u grupi II imale su veće vrednosti BRS-a, OR-a i SP-a u odnosu na grupu I. SBP. BRS – senzitivnost BRR-a; BEI – indeks efektivnosti BRR-a; OR – opseg delovanja BRR-a; SP – težište rada BRR-a; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; *p < 0.05; **p < 0.01; vs. grupa I (Studentov t-test).

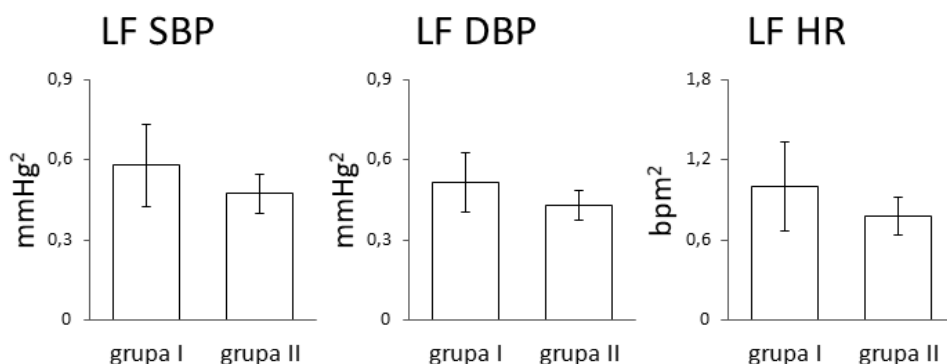
4.1.3. KRATKOTRAJNI VARIJABILITET KRVNOG PRITISKA I SRČANE FREKVENCIJE KOD WISTAR I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA

Spektralna analiza BP-a nije ukazala na promene u VLF zoni SBP-a i DBP-a kod BHR-ova pod bazalnim uslovima kada se uporede sa WR. Razlike nisu uočene ni na nivo VLF HR-a kod grupe I i grupe II (**Slika 17**).



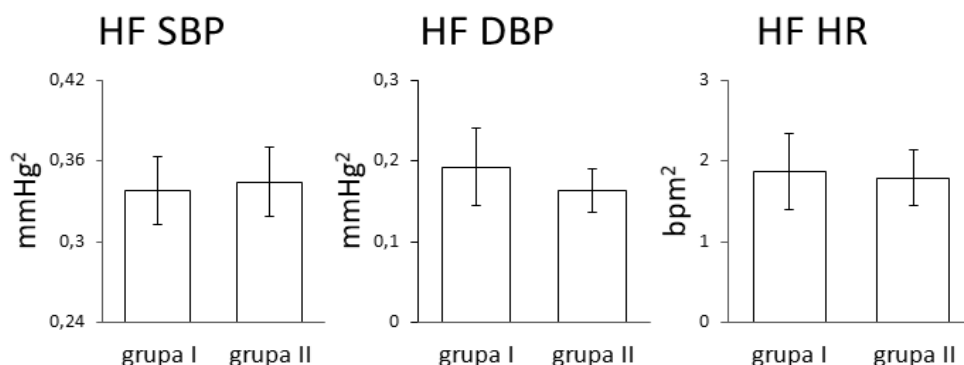
Slika 17. Kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a u VLF zoni kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja ± s.e.m.. Nije uočena promena VLF komponente varijabilitete BP-a i HR-a između grupe I i grupe II. VLF – zona veoma niskih frekvencija; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima.

U LF zoni BP-a kod grupe I vrednosti su bile uporedive sa onima kod grupe II. Vrednosti LF SBP-a i LF DBP-a ne govore u prilog povećanom simpatičkom uticaju na šta srce i krvne sudove kod BHR-ova pod bazalnim uslovima. Približne vrednosti su zapažene i na nivou LF komponente varijabiliteta HR-a kod oba soja pacova (**Slika 18**).



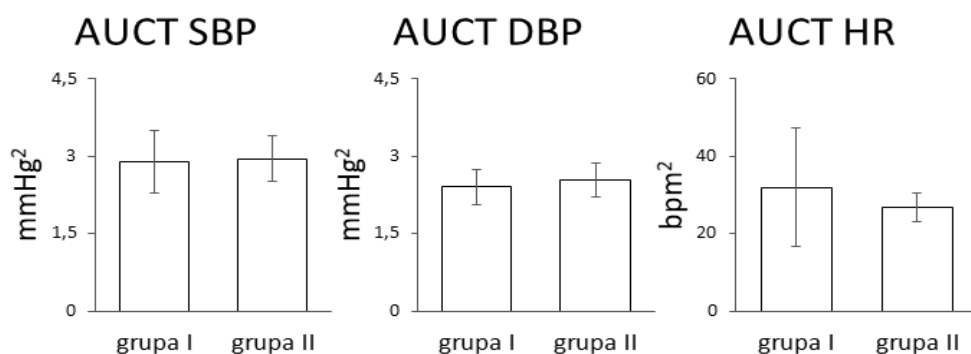
Slika 18. Kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a u LF zoni kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Nije uočena promena LF komponente varijabilitete BP-a i HR-a između grupe I i grupe II. LF – zona niskih frekvencija; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima.

Analizom varijabiliteta BP-a u zoni visokih frekvencija nije otkrivena promena kod grupe II u odnosu na grupu I. Takođe HF HR vrednosti se nisu značajno razlikovale između WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima (**Slika 19**).



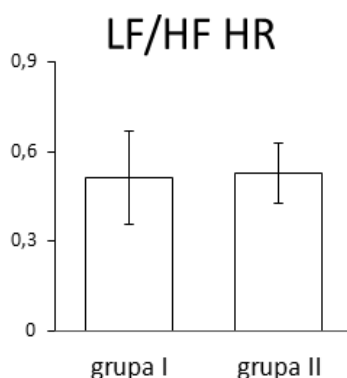
Slika 19. Kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a u HF zoni kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Nije uočena promena HF komponente varijabilitete BP-a i HR-a između grupe I i grupe II. HF – zona visokih frekvencija; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima.

Ukupni varibilitet SBP-a i DBP-a se nije razlikovao između WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. Takođe, nije postojala ni razlika u AUCT HR-a kod grupe I i grupe II. Odsustvo razlika u vrednostima ukupnog varijabiliteta je očekivano, s obzirom na to da se ni pojedinačne komponente varijabiliteta u svim frekvencijalnim zonama nisu razlikovale između WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima (**Slika 20**).



Slika 20. Ukupni kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a kod kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Nije uočena promena AUCT BP-a i HR-a između grupe I i grupe II. AUCT-ukupni kratkotrajni varijabilitet; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima.

Priznati klinički marker [202], koji govori o aktivnosti autonomnog nervnog sistema na srce, LF/HF HR indeks, nije se statistički značajno razlikovao između grupe I i grupe II. S obzirom da je LF HR odraz simpatovagalnog uticaja na srce, a HF HR govori o uticaju vagusa, njihov količnik, LF/HF HR indeks, nije ukazao na simpatičku dominaciju nad srcem kod BHR-ova pod bazalnim uslovima (**Slika 21**).

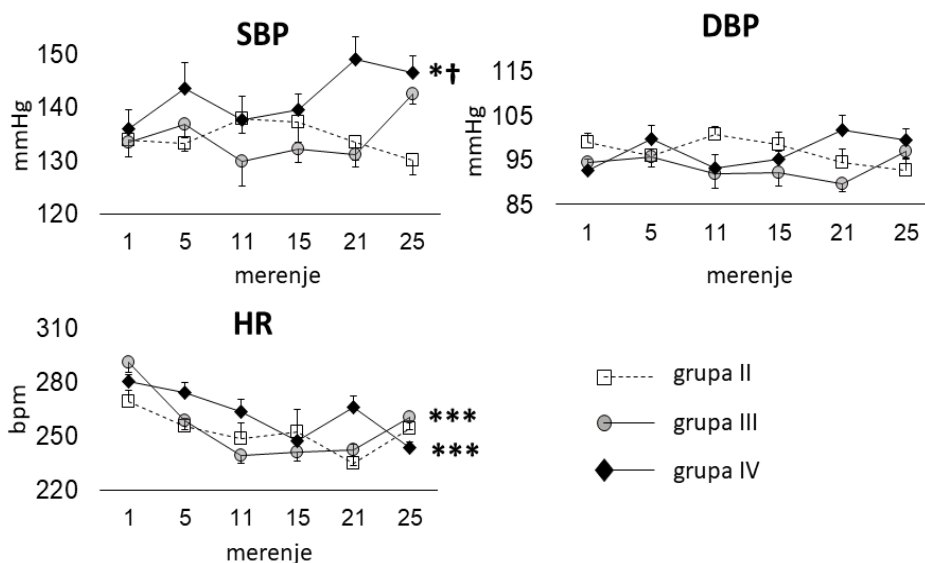


Slika 21. LF/HF HR indeks kod WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Spektralna analiza nije ukazala na značajne razlike između WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima. LF – zona niskih frekvencija; HF – zona visokih frekvencija; HR – srčana frekvencija; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima.

4.1.4. HEMODINAMSKI PARAMETRI KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

Izlaganje BHR-ova blagom opterećenju solju u trajanju od 24 nedelje nije uticalo na SBP i DBP, pa je BP ostao u granicama vrednosti uporedivim sa onim kod BHR-ova pod bazalnim uslovima, kao i sa početnim vrednostima. Nasuprot tome, blago opterećenje solju je izazvalo smanjenje HR-a kod istih životinja u odnosu na prvobitno merenje, ali je i dalje bilo približnih vrednosti kao kod BHR-ova pod bazalnim uslovima. Kada su BHR-ovi bili podvrgnuti blagom opterećenju solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu tokom 24 nedelje, javio se statistički značajan porast SBP-a tokom vremena u odnosu na početno merenje, ali i BHR-ove

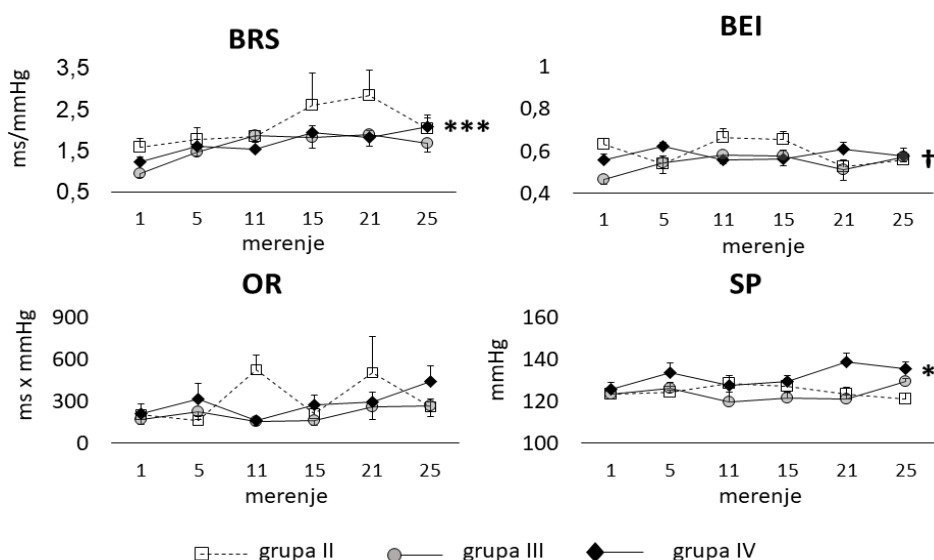
pod bazalnim uslovima, dok se DBP nije statistički značajno promenio. Kod ovih pacova HR se smanjio tokom trajanja protokola u odnosu na početne vrednosti, ali je bio uporediv sa onim kod BHR-ova pod bazalnim uslovima (**Slika 22**).



Slika 22. Hemodinamski parametri kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Blago opterećenju solju nije dovelo do porasta SBP-a i DBP-a, dok je dodavanje heterotopičnog stresa izazvalo porast SBP-a. Oba protokola su dovela do smanjenja HR-a; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotopičnom ponovljenom stresu; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. početno merenje (ANOVA ponovljenih merenja); † $p < 0.05$ vs. grupa II (hijerarhijska linearna regresija).

4.1.5. FUNKCIJA BARORECEPTORSKOG REFLEKSA KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

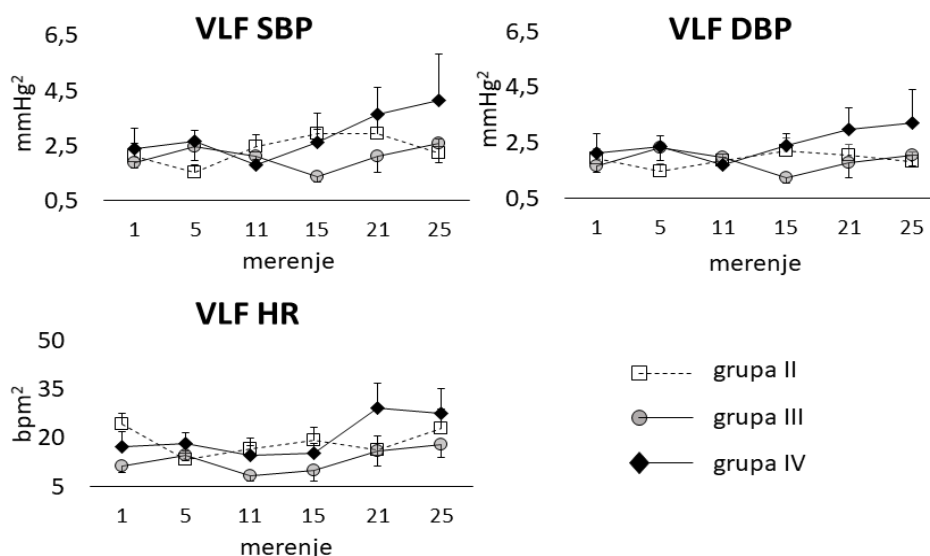
Analizom funkcije BRR-a sve tri grupe BHR-ova pod različitim protokolima uz pomoć metode sekvenci uočeno je da su vrednosti BRS-a kod BHR-ova pod bazalnim uslovima uporedive sa onima kod BHR-ova koji su tokom 24 nedeje bili izloženi povećanom unosu soli sa i bez primene heterotopičnog ponovljenog stresa. Ipak u IV grupi došlo je povećanja BRS-a tokom trajanja protokola u odnosu na početne vrednosti. BEI se nije značajno razlikovao između grupe II i grupe IV tokom trajanja protokola, dok su njegove vrednosti bile snižene kod grupe BHR-ova koji su pod blagim opterećenjem solju u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima. Opseg delovanja BRR-a nije se značajno razlikovao između BHR grupa, a nije došlo ni do njegove promene tokom 24 nedelje protokola ni u jednoj od ispitivanih grupa. Težište rada BRR-a u svim grupama figurisalo je oko sličnih vrednosti. Ipak, u grupi BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotopičnom stresu došlo je do porasta SP-a u vremenu u odnosu na prvo merenje (**Slika 23**).



Slika 23. Funkcija BRR-a kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Uočen je porast BRS-a i SP-a u grupi IV, dok su vrednosti BEI u grupi III bile značajno niže u odnosu na grupu II. BRS – senzitivnost BRR-a; BEI – indeks efektivnosti BRR-a; OR – opseg delovanja BRR-a; SP – težište rada BRR; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. početno merenje (ANOVA ponovljenih merenja); † $p < 0.05$ vs. grupa II (hijerarhijska linearna regresija).

4.1.6. KRATKOTRAJNI VARIJABILITET KRVNOG PRITISKA I SRČANE FREKVENCIJE KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

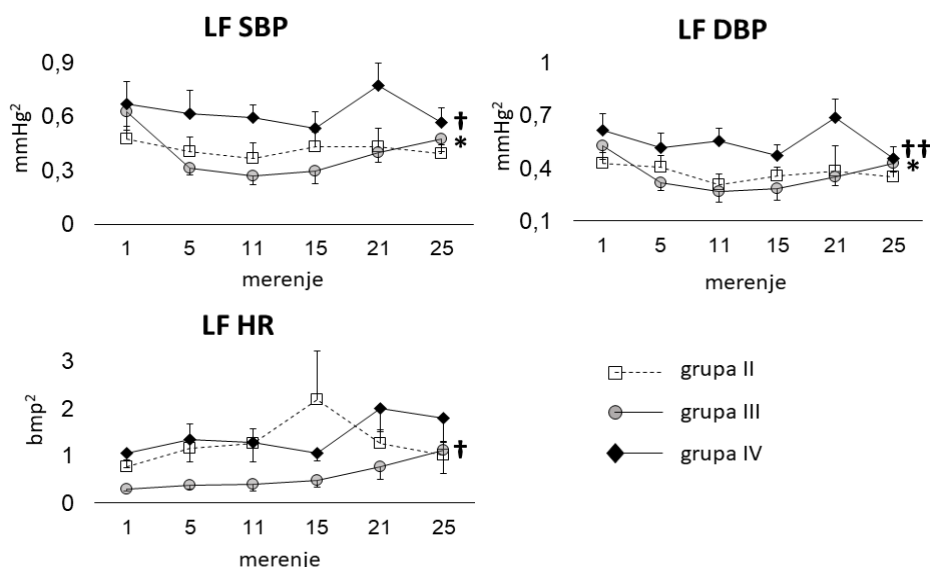
Spektralna analiza u zoni veoma niskih frekvencija SBP-a nije ukazala na značajne razlike u grupi BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju, kao ni kod BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu. Takođe nije došlo ni do statistički značajnog porasta VLF SBP-a tokom vremena u odnosu na početno merenje ni u jednoj od grupa. VLF DBP je bio približno istih vrednosti u sve tri grupe BHR-ova, a nije došlo ni do njegove promene tokom vremena u odnosu na početno merenje ni u jednoj od ispitivanih eksperimentalnih grupa. Kratkotrajni varijabilitet HR-a u VLF zoni je ostao neizmenjen tokom vremena posmatranja u svim BHR grupama. Takođe nije uočena statistički značajna razlika u VLF HR između grupe III i grupe IV u odnosu na grupu II (**Slika 24**).



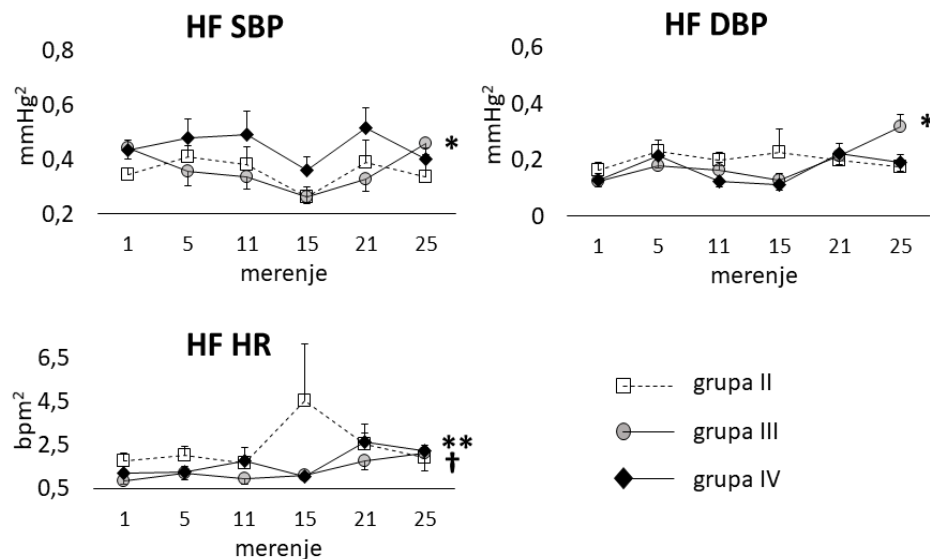
Slika 24. Kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a u VLF zoni kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Analizom BP-a i HR-a u VLF zoni nisu primećene raličke između grupa BHR-ova, kao ni u toku vremena unutar pojedinačnih grupa. VLF- zona veoma niskih frekvencija; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu.

Autonomni markeri BP-a kod grupe BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju ukazuju na redukciju simpatičkog uticaja i BRR-a na krvne sudove i srce tokom perioda od 24 nedelje. Kod ovih pacova su se smanjili LF SBP i LF DBP tokom vremena u odnosu na početne vrednosti ovih parametara, a LF HR je bio niži u poređenju LF HR BHR-ova pod bazalnim uslovima. Nasuprot tome, autonomni spektralni markeri LF SBP i LF DBP su bili viši kod BHR-ova koji su osim blagom opterećenju solju bili izloženi i heterotipičnom ponovljenom stresu, kad se uporede sa ovim parametrima kod BHR-ova pod bazalnim uslovima (**Slika 25**).

U zoni visokih frekvencija BP-a došlo je do promena tokom vremena u grupi III. Kod ovih životinja smanjio se HF SBP tokom vremena i došlo je do promene HF DBP-a u odnosu na početne vrednosti. U grupi BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu nije došlo do promene HF BP-a tokom vremena. Takođe, grupa III i grupa IV nisu imali stistički značajno drugačije vrednosti u odnosu na grupu II. Analiza HF HR-a pokazala je da je u grupi BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu došlo do povećanja ovog spektralnog parametra u toku vremena u odnosu na početne vrednosti. Takođe HF HR u grupi III je bio niži u odnosu na grupu II (**Slika 26**).

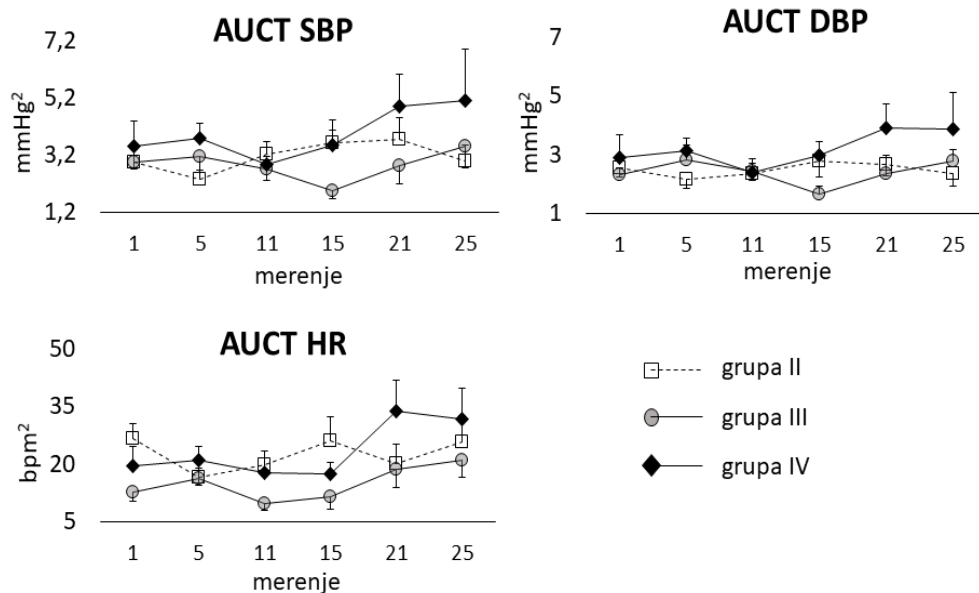


Slika 25. Kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a u LF zoni kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. LF BP se smanjio tokom vremena u grupi III, dok je LF HR bio niži u odnosu na grupu II. BHR-ovi koji su bili pod opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljeno stresu imali su više vrednosti LF BP-a u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima. LF- zona niskih frekvencija; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; * $p < 0.05$ vs početno merenje (ANOVA ponovljenih merenja); † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$ vs. grupa II (hijerarhijska linearna regresija).



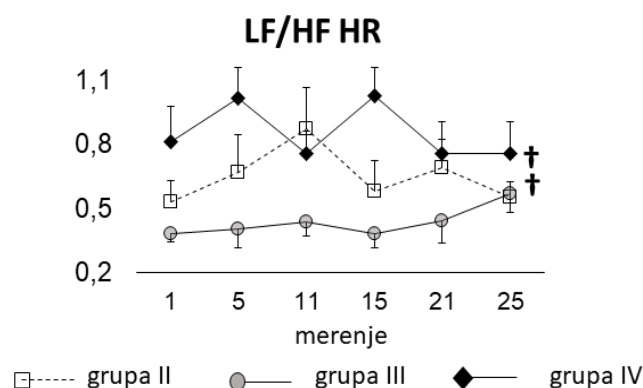
Slika 26. Kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a u HF zoni kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Uočen je pad HF SBP-a i tokom vremena i promena HF DBP-a u grupi III. HF HR je porastao u grupi IV, dok je bio niži u grupi III u odnosu na grupu II. HF- zona visokih frekvencija; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. početno merenje (ANOVA ponovljenih merenja); † $p < 0.05$; vs. grupa II (hijerarhijska linearna regresija).

Ukupni varijabilitet SBP-a i DBP-a, koji u najvećoj meri oslikava VLF komponentu varijabiliteta je bio nepromenjen u toku vremena u svim grupama, a vrednosti se nisu razlikovale između sve tri grupe, što je je istovetni nalaz i u VLF zoni BP-a. Takođe nisu uočene značajne razlike ni na nivou HF HR-a između grupa, kao ni u toku trajanja protokola (**Slika 27**).



Slika 27. Ukupni kratkotrajni varijabilitet BP-a i HR-a kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Nije primećena promena ukupnog kratkotrajnog varijabiliteta u toku trajanja protokola ni kod jedne od grupa, kao ni razlika u ovom parametru između grupa. AUCT – ukupni kratkotrajni varijabilitet; SBP – sistolni krvni pritisak; DBP – dijastolni krvni pritisak; HR – srčana frekvencija; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu.

Autonomni klinički marker LF/HF HR koji je pokazatelj odnosa dejstava simpatikusa i vagusa na srce bio je značajno viši u grupi BHR-ova koji su bili izloženi povećanom unosu soli i heterotipičnom ponovljenom stresu, dok je u grupi koja je bila samo pod blagim opterećenjem solju bio niži u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima. Ovaj parametar se nije promenio u toku vremena u odnosu na početne vrednosti ni u jednoj od grupa (**Slika 28**).

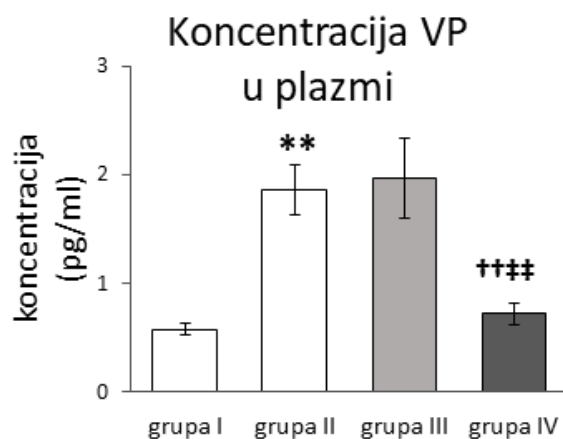


Slika 28. LF/HF HR indeks kod kod BHR-ova pod različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 7 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. LF/HF HR indeks je bio veći u grupi IV, a niži u grupi III u odnosu na grupu II. LF – zona niskih frekvencija; HF – zona visokih frekvencija; HR – srčana frekvencija; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; †p <0.05 vs. BHR pod bazalnim uslovima (hijerarhijska linearna regresija).

4.2. KONCENTRACIJA VAZOPRESINA U PLAZMI I GENSKA EKSPRESIJA VAZOPRESINA I NJEGOVIH RECEPTORA U PARAVENTRIKULARNOM JEDRU KOD WISTAR PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

4.2.1 KONCENTRACIJA VAZOPRESINA U PLAZMI KOD WISTAR PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

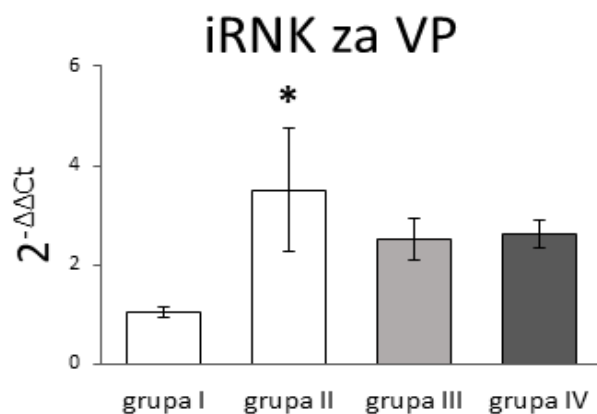
Na osnovu dobijenih koncentracija VP-a u plazmi utvrđeno je da BHR pod bazalnim uslovima imaju znatno više vrednosti cirkulišućeg VP-a nego WR pod istim uslovima. Kada se BHR-ovi izlože blago povećanom unosu soli, nivo VP-a u plazmi ostaje u istim granicama vrednosti kao i onaj kod BHR-ova pod bazalnim uslovima. Pridodavanje heterotipičnog ponovljenog stresa na blago opterećenje solju kod BHR-ova dovodi do snižavanja koncentracije VP-a u plazmi u poređenju sa BHR-ovima pod bazalnim uslovima, ali i BHR-ova pod blagim opterećenjem solju (**Slika 29**).



Slika 29. Koncentracija VP-a u plazmi kod WR-a pod bazalnim uslovima i kod BHR-ova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Zapaža se porast koncentracije VP-a u plazmi kod BHR-ova pod bazalnim uslovima u poređenju sa WR. Koncentracija VP-a u plazmi nije bila promenjena kod BHR pod uticajem blagog opterećenja solju, ali je uočen značajan pad nivoa VP u plazmi kada se BHR-ovi izlože kombinaciji blagog opterećenja solju i heterotipičnog ponovljenog stresa. VP – vazopresin; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; **p < 0.01 vs. grupa I; ††p < 0.01 vs. grupa II; †††p < 0.01 vs. grupa III (*one-way ANOVA, post hoc Tukey*).

4.2.2. GENSKA EKSPRESIJA VAZOPRESINA U PARAVENTRIKULARNOM JEDRU KOD WISTAR PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

Molekularno biološke analize tkiva PVN-a ukazale su na porast ekspresije gena za VP kod BHR-ova pod bazalnim uslovima kada se uporede sa WR koji su držani pod istim uslovima. Rezultati RT-qPCR analize na tkivima PVN-a izolovanim iz BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju, nisu pokazali promenu nivoa iRNK za VP u PVN-u u poređenju sa BHR-ovima pod bazalnim uslovima. Ovakav rezultat uočen je i u PVN-u grupe BHR-ova koji su osim opterećenja solju bili izloženi i heterotipičnom ponovljenom stresu (**Slika 30**).

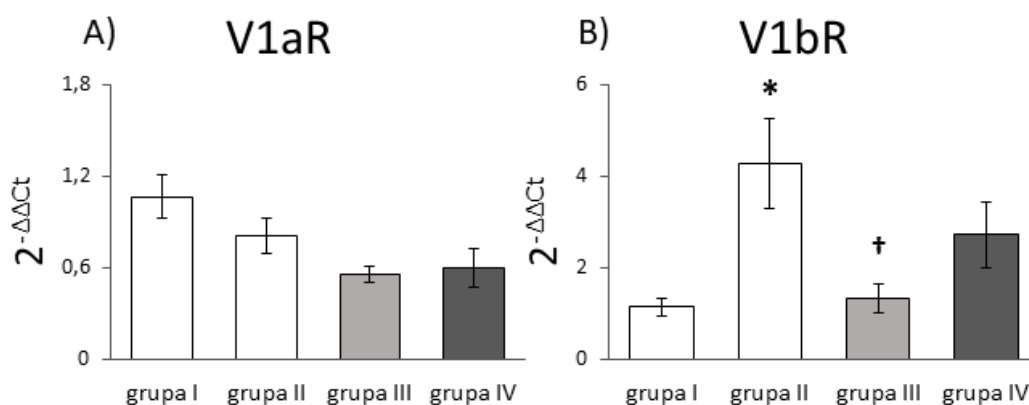


Slika 30. Stepen promene ekspresije gena za VP u PVN-u kod WR-a pod bazalnim uslovima i kod BHR-ova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. Zapaža se porast iRNK za VP kod BHR-ova pod bazalnim uslovima u poređenju sa WR. Genska ekspresija za VP ostala je nepromenjena kod BHR-ova pod blagim opterećenjem solju sa i bez primene heterotipičnog ponovljenog stresa. iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina; VP – vazopresin; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; * $p < 0.05$ vs. grupa I (*one-way ANOVA, post hoc Tukey*).

4.2.3. GENSKA EKSPRESIJA V1aR i V1bR U PARAVENTRIKULARNOM JEDRU WISTAR PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA POD BAZALNIM USLOVIMA I RAZLIČITIM PROTOKOLIMA

Analiza nivoa iRNK za V1aR u PVN-u WR-a i BHR-ova pod bazalnim uslovima nije pokazala značajne razlike između ova dva soja. Izlaganje BHR-ova blagom opterećenju solju nije uticalo na ekspresiju gena za V1aR u poređenju sa BHR-ovima pod bazalnim uslovima. Takođe, kombinovanje blagog opterećenja solju sa heterotipičnim stresom nije značajno izmenilo nivo genske ekspresije V1aR u odnosu na bazalne uslove (**Slika 31A**).

Poređenjem genske ekspresije V1bR u PVN-u pacova utvrđeno je da je nivo iRNK za V1bR značajno viši kod BHR-ova pod bazalnim uslovima u odnosu na WR pod istim okolnostima. Opterećenje BHR-ova blago povišenim unosom soli dovelo je do smanjenja genske ekspresije V1bR u odnosu na bazalne uslove. Pridodavanje heterotipičnog ponovljenog stresa blagom opterećenju solju nije imalo uticaja na nivo iRNK za V1bR kada se upoređi sa onim kod BHR-ova pod bazalnim uslovima (**Slika 31B**).



Slika 31. Stepennost promene ekspresije gena za receptore VP-a u PVN-u kod WR-a pod bazalnim uslovima i kod BHR-ova pod bazalnim uslovima i različitim protokolima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje 6 jedinica posmatranja \pm s.e.m.. A – nije uočena promena genske ekspresije V1aR između WR i BHR soja pod bazalnim uslovima, kao i kod BHR-ova pod različitim tretmanima; B – analizom nivoa ekspresije gena za V1bR zapažen je porast nivoa iRNK za V1bR kod BHR-ova pod bazalnim uslovima u poređenju sa WR. Takođe, uočen je značajan pad genske ekspresije za V1bR kad se BHR-ovi stave pod blago opterećenje solju, dok dodavanje heterotipičnog ponovljenog stresa nije indukovalo promene u nivou iRNK za V1bR. VP – vazopresin; V1aR – receptor za vazopresin tipa 1a; V1bR – receptor za vazopresin tipa 1b; grupa I – WR pod bazalnim uslovima; grupa II – BHR-ovi pod bazalnim uslovima; grupa III – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju; grupa IV – BHR-ovi pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu; * $p < 0.05$ vs. grupa I; † $p < 0.05$ vs. grupa II (*one-way ANOVA, post hoc Tukey*).

5. DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja su po prvi put pokazali razlike u ekspresiji gena za VP i njegove receptore u PVN-u BHR i WR soja. Kada se uporede sa WR, BHR-ovi koji su držani pod bazalnim uslovima imaju povišene srednje vrednosti SBP-a i DBP-a, a smanjene vrednosti HR-a. Osim toga, kod BHR-ova pod bazalnim uslovima uočeno je da BRR bolje radi, tj. porast BRS-a, OR-a i SP-a. Analizom genske ekspresije u PVN-u BHR-ova detektovano je uvećanje ekspresije gena za V1bR i VP, kao i viši nivo VP-a u plazmi pod bazalnim uslovima. Ipak ove životinje nisu imale izražene razlike u komponentama kratkotrajnog varijabiliteta BP-a i HR-a u odnosu na WR. Blago opterećenje solju kod BHR-ova nije imalo uticaja na BP, BRS, koncentraciju VP-a u plazmi i ekspresiju gena za VP u PVN-u. Ipak, pojenje 0.9% rastvorom NaCl doveo je do smanjenja ekspresije gena za V1bR. Kod ovih životinja uočeno je smanjenje efektivnosti BRR-a koje je praćeno sniženim vrednostima LF BP-a i HR-a, kao i HF BP-a i HR-a, ali i nižim vrednostima LF/HF HR indeksa. Kod BHR-ova koji su osim opterećenju solju bili izloženi i heterotipičnom ponovljenom stresu, smanjio se nivo VP-a u plazmi u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima, ali i BHR-ove pod blagim opterećenjem solju. Ipak ovi pacovi nisu imali izmenjenu ekspresija gena za VP i njegove receptore u PVN-u u donosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima. Ove životinje razvile su hipertenziju (porast SBP-a) i pokazale više vrednosti simpatičkih spektralnih markera: LF-BP i LF/HF-HR indeksa, kao i HF HR-a, ali i pad vrednosti HR-a.

Poznato je da BHR-ovi nasleđuju genetsku informaciju za razvoj hipertenzije od svoje SHR majke, ali etiologija granične hipertenzije nije dobro izučena. Na osnovu rezultata ovog istraživanja, VP se istakao kao potencijalni učesnik mehanizama koji dovode do razvoja BH. Ova pretpostavka je potkrepljena činjenicom da je VP prisutan u moždanim strukturama koje su od velike važnosti za kardiovaskularnu regulaciju i šalju svoje projekcije do brojnih moždanih centara. Tako je na primer, osim u PVN-u i SON-u, prisustvo VP-a potvrđeno i u suprahijazmatičnom jedru (lat. *suprachiasmatic nucleus* – SCN), koje učestvuje u regulaciji cirkadijalnih ritmova u telu, odakle polaze mnoge vazopresinske projekcije ka različitim centralnim strukturama, kao što su periventrikularno preoptičko jдро (engl. *nucleus preopticus periventricularis*) i OVLT [206–208]. Premda postoji argumentacija protiv pretpostavljenje uloge VP-a u razvoju hipertenzije [209], mnoge studije su pokazale da VP i njegovi receptori u sistemske cirkulaciji i CNS-u doprinose nastanku ovog stanja [2,39,41].

Kod SHR-ova i ljudi koji pate od primarne hipertenzije nađena je veća koncentracija VP-a u plazmi, kao i povećana osetljivost vaskulature na injektovan VP, što nije potvrda njegove direktne uloge u porastu pritiska, ali svakako korelira sa ozbiljnošću kliničke slike [41,42]. Davanje infuzije VP-a normotenzivnim WR i SHR-ovima, ukazalo je na snažan presorni efekat VP-a kod SHR-ova usled smanjene funkcije kardiovaskularnog refleksa [42]. Dalje, hronična stimulacija perifernih vaskularnih V1aR agonistom kod normotenzivnih životinja, za ishod ima razvoj hipertenzije [210,211]. U genetskoj hipertenziji Okamoto-Aoki SHR soja, a naročito kod varijeteta sklonih moždanom udaru (engl. *stroke prone* – SP), nivo VP-a u plazmi je povišen i primena antitela i antagonistu za VP izaziva prolazno smanjenje BP-a [39,212].

Takođe, postoje brojni dokazi da se koncentracija VP-a u mozgu menja u genetskoj hipertenziji [213,214]. *Möhring* i saradnici su pokazali da je nivo VP-a u neurohipofizi bio povećan za 26 % kod SHR-ova u poređenju sa normotenzivnim kontrolama, dok je u moždanom stablu i hipotalamusu bio snižen [213,215]. Takođe, druga istraživačka gupa je pronašla da je kod genetski hipertenzivnih pacova u prehipertenzivnom stadijumu nivo VP-a u PVN-u približan onom kod normotenzivnih pacova, dok sa razvojem hipertenzije on opada [216].

Suprotno, *Yi* i saradnici su pokazali da je ekspresija VP-a u SON-u i PVN-u povećana u hipertenzivnom stadijumu kod SP-SHR-ova [44]. Dodatno, *Van Tohl* i saradnici utvrdili su da se povećanje ekspresije VP-a kod SHR-ova u PVN-u dešava još u prehipertenzivnom stadijumu. Iako ovim eksperimentim nije potvrđeno da je VP uzročnik hipertenzije, nedvosmisleno je ukazano na činjenicu da porast VP-a u mozgu nije njena posledica. Ovi autori su zaključili da je hipotalamo-neurohipofizni sistem SHR-ova u stanju povišene aktivnosti VP-a [217]. Kontradiktornost navedenih rezultata može biti posledica primene različitih tehnika određivanja nivoa VP-a u moždanim jedrima. U ovoj studiji korišćena je detekcija na nivou nukleinskih kiselina, što se poklapa sa metodološkim pristupom istraživačkih grupa *Yi*-a i *Van Tohl*-a. Važan je i nalaz, da lezije PVN-a kod SHR-ova daju niže vrednosti BP-a kod ovih životinja u mlađoj dobi, nakon čega vremenom dolazi do porasta pritiska, ali su njegove vrednosti daleko manje nego kod kontrolnih pacova. Zato je PVN identifikovan kao struktura koja je važna u početnoj fazi razvoja hipertenzije, ali i u ispoljavanju maksimalnih hipertenzivnih efekata u kasnijim stadijumima [218]. Takođe, u različitim modelima eksperimentalne hipertenzije pronađena je izmenjena ekspresija njegovih receptora u mozgu [20,219].

VP ispoljava raznolike i složene efekte na kardiovaskularni sistem, od kojih neki imaju direktno, dok drugi imaju indirektno dejstvo na kardiovaskularnu homeostazu [41]. Poznato je da je BP proporcionalan ukupnom perifernom otporu i minutnom volumenu srca. Nakon što se oslobodi iz magnocelularnih neurona, VP dospeva u cirkulaciju gde preko V1aR izaziva kontrakciju glatke muskulature krvnih sudova, što rezultuje povećanim perifernim otporom, dok angažovanjem V2R na sabirnim kanalićima bubrega učestvuje u zadržavanju vode u telu [70,83]. Njegova antidiuretička aktivnost važna je za održanje osmolalnosti plazme, koncentracije soli i zapremine vanćelijske tečnosti, čime VP posredno utiče na volumen krvi i minutni volumen srca [41]. Dakle, vazokonstrikcija i očuvanje nivoa telesnih tečnosti su homeostatski mehanizmi posredovani VP-om, koji omogućavaju održanje cirkulacije i od životne su važnosti u uslovima narušenog nivoa telesnih tečnosti, kao što su hemoragija i hipovolemija. Takođe, dehidratacija i hemoragija povećavaju simpatičku aktivnost i oslobađanje VP-a proporcionalno volumenu krvi, što je važno za održavanje normalnog BP-a [41,220–223].

VP iz cirkulacije se pokazao kao snažan vazokonstriktor kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima [41,70,224]. Ipak, smatra se da u *in vivo* uslovima nisu sva vaskularna korita jednako osetljiva na VP. *Liard* je sumirao uticaj VP-a na regionalnu hemodinamiku: najosetljivija su korita skeletnih mišića, kože, masnog tkiva, splanhično i mezenterično korito, kao i ono u mozgu i miokardu, dok u bubregu, jetri i plućima ne dolazi do porasta perifernog otpora usled dejstva VP-a [225]. Povećanje pulsa, respiracije i telesne temperature se javlja čak i pri malim porastima koncentracije VP-a u plazmi, kakvi se susreću u dehidrataciji [226–228]. Kada se sistemski ubrizga neanestetisanim životinjama, VP ne dovodi do povećanja BP-a ukoliko njegova koncentracija daleko ne premaši fiziološke vrednost (100 pg/ml) [229–231]. Razlog za to je aktivacija puferskih mehanizama poput porasta BRS-a, koji sprečava povećanje pritiska, uprkos pojačanom perifernom otporu. Kao rezultat nastaje bradikardija i pad minutnog volumena srca, koji su posledica redukovane simpatičke aktivnosti na srce i efikasno se protive perifernom otporu [41,232]. Vazopresin izaziva veće smanjenje HR-a shodno porastu BP-a, u poređenju sa drugim vazokonstriktorima, poput angiotenzina ili α -adrenergičkih agonista [42]. Infuzija VP-a dovodi do izraženije aktivacije baroreceptora pri određenom BP-u, nego drugi vazokonstriktori [72]. Kod ljudi i životinja, kod kojih su puferski mehanizmi ugašeni i priliv informacija iz baroreceptora prekinut, javlja se dozno zavisno povećanje presornog efekta VP-a [231,233,234].

VP svoje dejsvo na BRS postiže u nivou AP-a [232]. Iako su efekti VP-a na refleksnu kardiovaskularnu funkciju kontradiktorni, pretpostavlja se da zavise od aferentnih baroreceptorskih ulaza sa periferije [114,232]. Ipak, većina *in vitro* i *in vivo* studija pokazuje da vazopresin u nivou AP-a povećava BRS [38,114,232,235]. Dodatna potvrda za ovu tvrdnju su eksperimentalne lezije AP-a koje sprečavaju VP iz cirkulacije da moduliše aktivnost BRR-a [236]. Takođe kod VP-deficijentnih *Brattleboro* pacova, BRS je u značajnoj meri smanjen [237].

AP je cirkumventrikularni organ i nema krvno-moždanu barijeru, što je čini podložnom dejstvu hormona iz cirkulacije [2]. Gusto je povezana sa brojnim moždanim strukturama važnim za kardiovaskularnu regulaciju, između ostalog i NTS-om, gde se završavaju aferentna vlakna baroreceptora [238,239]. Takođe AP utiče na aktivnost neurona u RVLM-u, što bi takođe moglo igrati ulogu u modulaciji simpatičke nervne aktivnosti. Dokazano je i prisistvo receptora za vazopresin u AP-u [240]. Postoje brojni farmakološki dokazi da VP moduliše BRS u AP-u pacova angažovanjem dva tipa receptora: V1a i V2 [235,241,242]. Većina nalaza sugeriše da VP ispoljava svoje efekte na funkciju BRR-a preko V1aR. Pa tako, mikroinjekcije niskih doza antagoniste V1aR u AP-u ukidaju efekte uvećane refleksne simpatoinhibicije cirkulišućeg VP-a [235]. Dalje, intravenski dat antagonista V1aR ili mikroinjektovan u NTS, ne utiče na refleksne efekte VP-a, što ide u prilog tome, da VP iz cirkulacije svoje efekte na refleksnu kontrolu simpatičkog nervnog sistema i HR, ipak postiže u nivou AP-a [114]. Međutim, dejstvo VP-a u AP-u na funkciju BRR-a podložno je uticaju α -adrenergičkih receptora iz NTS-a. Naime, blokadom ovih receptora ukida se dejstvo VP-a i AP-a na simpatički nervni sistem. S obzirom na to, da se u NTS-u interpretiraju i modulišu informacije koje pristižu od baroreceptora, smatra se da NTS doprinosi uvećanju simpatoinhibicije posredovane VP-om u AP-u [114].

U ovim eksperimentima uočen je uvećan nivo iRNK za VP u PVN-u BHR-ova u poređenju sa WR. Ovaj porast stepena ekspresije gena za VP, može ukazivati na porast sinteze VP-a, ali i njegovo intezivnije otpuštanje u cirkulaciju. Viši nivo VP-a u plazmi bi mogao dovesti do uvećanja perifernog otpora, ali i rasta BRS-a u nivou AP, što vodi efikasnom smanjenju HR-a, koje je zapaženo i u našim ekperimentima. Na ovaj način pritisak bi se mogao održavati u okviru graničnih vrednosti. Važno je naglasiti da je BRR jedan od glavnih regulatora otpuštanja VP-a. Povećana baroreceptorska stimulacija pojačava inhibiciju MCN-a [2,169]. Ipak, kod BHR-ova koji imaju hronično povećan BP, BRR ne može da suprimira otpuštanje VP-a u cirkulaciju bez obzira na povećanje senzitivnosti. Ovo bi mogla biti posledica resetovanja BRR-a na više vrednosti BP-a o čemu govori i pomeranje SP-a, bez promena u BEI (Tabela 1). Resetovanje BRR-a, pre nego njegova disfunkcija je važan mehanizam održavanja hipertenzije kod SHR-ova [243]. Ipak, istovremeni porast BRS-a i OR-a BRR-a u BH može voditi iscrpljivanju BRR-a kada se životinja izloži nepovoljnim uslovima kao što je stres.

Osim toga, naši rezultati ukazali su i na povećanu ekspresiju gena za V1bR kod BHR-ova pod bazalnim uslovima. V1bR bi mogao biti uključen kako u autokrinu regulaciju oslobađanja VP-a, tako i u aktivaciju okolnih neaktivnih MCN-a, da povećaju sintezu i otpuštanje VP-a, kod ovih životinja. Dvojno imunohistohemijsko bojenje pokazalo je da se autoreceptori za VP nalaze na neuronima PVN-a i SON-a koji sadrže VP [103,244]. Dalje je utvrđeno da su V1bR bogato ekspimirani u PVN-u i kolokalizuju sa V1aR na telu i dendritima sekretujućih MCN-a [92,244]. Takođe, prisustvo oba tipa receptora potvrđeno je i na citoplazmatskim vezikulama koje sadrže i VP. Pretpostavlja se da su ove vezikule, zapravo sekretorne granule i da prilikom njihove fuzije sa somatodendritskom membranom, dolazi do insercije VR u samu membranu, kao i oslobađanja VP-a u vanćelijsku sredinu [91]. Pokazano je da tačkaste mutacije u promotoru gena za VP mogu voditi povećanju ekspresije VP-a i pojačanom dendritskom oslobađanju [96]. Ovaj intranuklearno oslobođen VP moduliše električnu aktivnost MCN-a [91,92]. Iako su brojne studije potvrdile oslobađanje VP-a na somatodendritskom nivou [88-90], pokazano je da

lokalno dat VP ima različita dejstva na aktivnost MCN-a [103] Efekat vazopresina zavisi od polarizacije membrane, koja utiče na fazni obrazac aktivnosti samog neurona. Na ovaj način ujednačava se aktivnost čitave grupe MCN-a, od čega zavisi i koncentracija VP-a u plazmi [102–104].

Iako je poznato da je autokrina regulacija oslobađanja VP-a dominantno posredovana V1aR [91], u našim eksperimentima nivo ekspresije V1aR je bio približno isti kod WR-a i BHR-ova. Ovi autoreceptori menjaju električnu aktivnost ćelija, a posredno i nivo VP-a u plazmi koji se protivi promenama osmolalnosti [107–109,245]. Ipak, bez obzira na ova saznanja, distribucija V1aR receptora u hipotalamusu i njihova regulacija u odgovoru na promenu osmolalnosti plazme, bile su slabo istražene. Početkom XXI veka, *Hurbin* i saradnici su na osnovu svojih eksperimenata zaključili da dehidratacija kod pacova uvećava nivo iRNK za V1aR kao i samih receptora u MCN, dok povećan unos vode stabilizuje nivo V1aR blizu kontrolnih vrednosti. Tretman nije imao uticaja na nivo V1aR u sekretornim granulama [91]. Dalje je pokazano da V1aR eksprimirani i na PCN, kao i da inranuklearno oslobođen vazopresin tonično stimuliše ove presimpatičke neurone, što vodi integraciji humoralnog i neurogenog odgovora na osmotski izazov [67,139]. *Lozić* i saradnici su u okviru svoje studije ukazali da povećana ekspresija V1aR u PVN-u smanjuje BRS pod bazalnim fiziološkim uslovima i pojačava neurokardiogeni odgovor, kada se životinje izlože stresu [246]. Ova povećana kardiovaskularna vulnerabilnost na stres glavni je faktor rizika za razvoj hipertenzije. Naši rezultati ne ukazuju na promene u ekspresiji V1aR u PVN-u kod BHR-ova pod bazalnim uslovima, ali ni kada su pod blagim opterećenjem solju sa i bez stresa. Najpre, ovo istraživanje ukazuje na povećanu ekspresiju V1bR, kao potencijalni mehanizam uključen u autokrinu pozitivnu povratnu spregu kontrole oslobađanja VP-a kod BHR-ova. Autokontrola MCN-a VP-om je složen mehanizam i verovatno predstavlja rezultat inhibitornih i ekscitatornih dejstava V1aR i V1bR [92].

Sve je veći broj dokaza da je kardiovaskularni (BP i HR) kratkotrajni varijabilitet rezultat združene aktivnosti brojnih homeostatskih mehanizama. Povećana kardiovaskularna varijabilnost je faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti [247,248]. Nekoliko je homeostatskih mehanizama koji održavaju BP oko istih vrednosti: autonomni (neuralni) refleksi, hormoni (komponente RAS, VP) i signalni molekuli (NO) [202]. Smatra se da su za nastanak VLF oscilacija odgovorni termoregulacija, RAS (u najvećoj meri doprinosi nastanku VLF SBP), spontana miogena aktivnost krvnih sudova, dok ih BRR puferuje [249–251]. VLF oscilacije najviše doprinose snazi ukupnog spektra BP-a i HR-a [252]. LF BP (neurogene oscilacije ili *Mayer*-ovi talasi) ukazuju na simpatički upliv na krvne sudove, ali i uticaj BRR-a [253–255]. HF oscilacije su najmanje oscilacije u spektru BP-a i još se nazivaju mehaničke, jer nastaju kao posledica respiracije [253]. Takođe, pokazano je da LF HR odraz simpatovagalne eferentne aktivnosti na srce, dok HF HR reprezentuje samo vagalnu [202]. *Akselrod* i saradnici pokazali su da se na kratkotrajni varijabilitet može selektivno uticati farmakološki i da se spektralna analiza može iskoristiti za procenu kardiovaskularnih kontrolnih mehanizama [256]. U kliničkoj i eksperimentalnoj praksi, simpatički izlaz usmeren ka krvnim sudovima i srcu može se proceniti indirektno preko autonomnih spektralnih markera: LF BP i LF/HF HR [202]. Na primer, porast LF BP-a je karakteričan za stanje stresa i hemoragije i predstavlja odraz povećane simpatičke aktivnosti ka krvnim sudovima, dok uvećanje LF/HF HR indeksa govori o pojačanom dejstvu simpatikusa na srce [202,257,258]. Smatra se da su efektori povećanog simpatičkog uticaja upravo neuroni PVN-RVLM puta [246,259,260]. U parvocelularnom delu PVN-a VP je eksprimiran u brojnim neuronima koji se projektuju do vazomotornog centra u RVLM-u smeštenog u moždanom stablu i do SPN-a lokalizovanih u IML-u u kičmenoj moždini, gde se prisutni i V1aR [60,261]. Spektralna analiza u ovim eksperimentima nije ukazala na promene kardiovaskularnog kratkotrajnog varijabiliteta između WR i BHR soja. Vrednosti ukpnog varijabiliteta BP-a i HR-a, kao i njihovih pojedinačnih komponenti bile su uporedive

između grupa, što pre svega ukazuje na očuvan integritet autonomnog nervnog sistema kod BHR-ova, ali i potvrđuje nenarušenu funkciju BRR-a kao puferskog mehanizma. Ovi eksperimenti nisu ukazali na razlike u LF BP i LF/HF HR spektralnim markerima između sojeva pod bazalnim uslovima, pa se pretpostavlja da se povećanje eksresije VP-a i V1bR u PVN-u BHR-ova javlja u magnocelularnom delu i da ne menja neurogenu kardiovaskularnu kontrolu kod ove grupe životinja. Takođe, odsustvo promene nivoa V1aR koji su medijatori povećanog simpatičkog odliva ka srcu i krvnim sudovima, ide u prilog nalazima spektralne analize.

Uprkos razvoju terapije, primarna hipertenzija je pod kontrolom u svega 45% lečenih slučajeva, dok većina antihipertenzivnih lekova dovodi do sniženja BP-a tek kod 50-60% pacijenata [262,263]. Smatra se da je glavni razlog za to veliki broj mehanizama koji učestvuje u nastanku hipertenzije [23]. Ideja da je hipertenzija multifaktorska bolest i da nastaje kao posledica interakcije genetskih činilaca i faktora iz okruženja, prvo je predložena od strane *Folkow*-a [264]. Unos soli kroz hranu i spoljašnji (psihosocijalni) stres se smatraju važnim sredinskim faktorima rizika za razvoj hipertenzije [59,265].

Visok unos soli vodi hidromineralnom disbalansu koji je praćen povećavanjem Na^+ u plazmi, pa samim tim i osmolalnosti [139]. Vazopresinski sistem je deo homeostatske mreže koja ne dozvoljava da nivo Na^+ varira više od 3% i VP u tim uskim granicama mora da ispuni svoju funkciju [102,266].

PVN igra važnu ulogu u generisanju povećane simpatioekscitacije i posledičnom porastu BP-a, kao odgovor na povišen unos soli, ali tačni mehanizmi su nepoznati [139]. Kod normotenzivnih subjekata hroničan povećan unos soli dovodi do smanjenja RSNA, što u kombinaciji sa inhibicijom renin-aldosteron-angiotenzin sistema vodi pojačanoj ekskreciji soli i održanju balansa Na^+ [267,268]. U hipertenziji, ovaj efekat je još više naglašen. Usled intravenskog davanja izotoničnog rastvora, SHR-ovi ispoljavaju pojačanu natriurezu [269,270], a pokazano je da je to posledica smanjenja RSNA [270]. Dalje, *Kapusta* i saradnici su sugerisali da upravo PVN igra ulogu u renalnoj simpatoinhibiciji kao odgovor na povećan unos soli [271,272], ali i VP iz cirkulacije preko AP-a [235,273]. Takođe, kada se BHR-ovi podvrgnu povećanom unosu soli (8%) oni razvijaju hipertenziju i pojačava se natriuretski odgovor, slično kao i kod njihovih SHR majki, dok se ovakav efekat eliminiše usled renalne denervacije [274]. Ipak, smatra se da je priroda ovakvih promena različita kod ovih sojeva, naročito jer strukturne izmene kod SHR-ova i progresija hipertenzije, nastaju u ranoj životnoj dobi, nezavisno od spoljašnjih činilaca, kao što je povećan unos soli [275]. BHR-ovi koji su pili 1 % rastvor NaCl reagovali su kao normotenzivne kontrole [274]. Ovo je podudarno i sa rezultatima našeg istraživanja. U ovim eksperimentima, BHR-ovi koji su 24 nedelje pili 0.9% rastvor NaCl (blago opterećenje solju) pokazuju smanjenje LF BP-a, koje indirektno ukazuje i na pad simpatičke aktivnosti, što dalje omogućava efikasnu natriurezu. U prilog smanjenju RSNA, ide i snižen nivo ekspresije iRNK za V1bR u PVN-u BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju. Pokazano je da primena antagoniste V1bR (nelivaptan) u PVN-u sprečava porast RSNA izazvan VP-om [276]. Pored toga, smanjenje V1bR u PVN-u može da svedoči i o ukidanju pozitivne autokrine regulacije sinteze i oslobađanja VP-a. Kod ove grupe BHR-ova pod blagim opterećenjem solju primećene su i niže vrednosti LF HR-a u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima što ukazuje i na smanjenje simpatičkog delovanja na srce. Takođe, uočene su i snižene vrednosti BEI, što govori o smanjenoj efikasnosti BRR-a. Nije došlo do promena ukupnog varijabiliteta BP-a i HR-a, što je očekivano s obzirom na odsustvo promene VLF oscilacija koje najviše doprinose AUCT. Osim toga povećana simpatioekscitacija izazvana povećanim unosom soli se uglavnom vezuje za angažovanje V1aR u PCN delu PVN-a [67,139], a u našim eksperimentima nije zapažena promena nivoa ovih receptora u PVN-u, pa se pad LF oscilacija BP-a pre može pripisati sniženoj ekspresiji V1bR. Sveukupno, ovi podaci isključuju mogućnost da se kod BHR-ova pod hroničnim

blago povećanim unosom soli javlja hidromineralni disbalans koji bi doprinosa negativnim promenama u regulaciji BP-a.

Psihološki i emocionalni stres bude kardiovaskularni odgovor koji uključuje porast SNA, BP-a i HR-a [277]. Smatra se da PVN nema značajnu ulogu u generisanju simpatoekscitacije kod primene akutnog stresa, ali da je važan u koordinisanju simpatoadrenalnog i neuroendokrinog odgovora na hronični stres [278–280]. Pokazano je da presimpatički neuroni PVN-a u određenoj meri doprinose porastu SNA kod pojedinih tipova psihološkog stresa [281].

Mehanizmi kojima sredinski stres kod BHR-ova izaziva hipertenziju su nepoznati. Prolongirana aktivacija sistema koji služe za adaptaciju na stres može dovesti do alostatskog prezasićenja, što rezultuje patofiziološkim promenama [282].

U ovom eksperimentu, BHR-ovi koji su bili pod blagim opterećenjem solju i izlagani heterotipičnom ponovljenom stresu u trajanju od 24 nedelje, pokazuju porast SBP-a u posmatranom periodu u poređenju sa početnim vrednostima, ali i u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima. Odsustvo statističke značajnosti kod porasta DBP-a mogao bi biti posledica poboljšane kontrole pritiska od strane BRR-a usled porasta BRS-a tokom vremena, iako se delimična habituacija ne može isključiti. U ovoj grupi uočen je i porast SP-a, što ukazuje da se BRR resetovao na više vrednosti pritiska.

Oscilacije HR-a u HF zoni su se povećale tokom vremena, što ide u prilog rastu vagusnog dejstva na srce, verovatno barorefleksnog porekla, koji optimalno funkcioniše na većim vrednostima BP-a. Varijabilitet arterijskog BP-a raste sa razvojem hipertenzije [190]. U poređenju sa BHR-ovima pod bazalnim uslovima, vrednosti spektralnih markera LF SBP, LF DBP, i LF/HF HR bile su značajno više kod BHR-ova izlaganim opterećenju solju i stresu. Ovo ukazuje na pojačano simpatičko pražnjenje ka krvnim sudovima [253,283] i srcu [253,256,283,284] kod BHR-ova koji su izlagani stresu i sugeriše da je ovo mehanizam koji stoji iza sistolne hipertenzije indukovane stresom. Malo je verovatno da porast autonomnih spektralnih markera oslikava povećanu senzitivnost periferne vaskulature i kardijačnog tkiva na kateholamine, jer je pokazano da opterećenje solju od 0.8 % NaCl kod BHR-ova ne modifikuje reaktivnost kardiovaskularnog tkiva na stres [190]. Nisu uočene promene u drugim komponentama kardiovaskularnog varijabiliteta, kao ni u ukupnom varijabilitetu BP-a i HR-a.

Povećan unos soli interaguje sa hroničnim stresom, menjajući nivo noradrenalina u jedrima hipotalamusa [285]. *DiBona* i saradnici su istraživali efekte povećanog unosa soli kod BHR-ova (8 % i 1 %) kada se ove životinje izlože akutnom *air-jet* stresu. Njihova studija je demonstrirala da ovaj tip stresa izaziva reverzibilni porast BP-a i RSNA, kao i smanjenje natriureze kod BHR-ova koji su bili opterećeni sa 8 % NaCl. [286]. Razlog za odsustvo ovog efekta kod grupe BHR-ova koja je bila pod 1 % opterećenjem NaCl može ležati i u prirodi samih eksperimenata, koji su bili akutnog tipa. *Koepke* i saradnici [287] su pokazali da kod SHR-ova koji su pili 0.9 % rastvor NaCl, povećan unos soli oralno uvećava eferentnu RSNA u odgovoru na sredinski *air-jet* stres, vodeći većoj renalnoj vazokonstrukciji i izraženom antinatriuretskom odgovoru [287]. Isto je pokazano i na Dahl soju pacova osetljivih na so (engl. *Dahl salt-sensitive* – DS), kao i onih koji to nisu (engl. *Dahl salt-resistant* – DR), a koji su bili izloženi povećanom unosu soli [288]. Dakle so povećava osetljivost simpatičkog nervnog sistema na neurogene stimulse kod životinja sa genetskom predispozicijom za hipertenziju. Osim toga, psihološki stres smanjuje natriurezu kod osoba sa BH ili porodičnom istorijom hipertenzije [289]. Moguće je da slična kombinacija stresora i povećanog unosa soli u ovim eksperimentima, doprinela uvećanju RSNA, smanjenoj natriurezi i aktivaciji dopunskih mehanizama koji vode povećanju pritiska.

Stres u velikoj meri stimuliše vazopresinergički sistem [290–292] i često ga prati porast lučenja VP-a u cirkulaciju [293]. Međutim, ne izazivaju svi oblici stresa povećanje nivoa VP-a u plazmi [118] i regulacija oslobađanja VP-a u cirkulaciji zavisi od tipa stresora [136,185,294,295]. Na primer, test prinudnog plivanja (kombinacija fizičkog i emocionalnog stresa) izaziva oslobađanje VP-a unutar PVN-a, a ne utiče na sistemsku sekreciju VP-a [295]. Dalje je pokazano da stresori koji uzrokuju jake emocionalne reakcije, inhibiraju sistemsku sekreciju VP-a [296]. Rezultati ove studije ne podržavaju ulogu perifernog VP-a u razvoju hipertenzije indukovane stresom. Kod BHR-ova koji su bili pod blagim opterećenjem solju i izloženi heterotipičnom ponovljenom stresu, nivo VP-a u plazmi je bio snižen u odnosu na BHR-ove pod bazalnim uslovima, što je u skladu sa literaturom [296]. U ovim eksperimentima BHR-ovi su izlagani air-jet stresu koji spada u snažne emocionalne stresore [297]. Prebacivanje životinja iz pojedinačnih u grupne kaveze sa drugim jedinkama predstavlja kombinaciju straha od nepoznatog sa psihosocijalnim stresom [298]. Wotjak i saradnici su pokazali da strah od nepoznatog ne izaziva promene na nivou VP-a u hipotalamusu [186]. Takođe promene gustine receptora ne moraju biti praćene izmenjenim obrascem oslobađanja samog neuropeptida, ali i obrnuto [299,300]. Dakle, naši eksperimenti ukazuju da povezivanje ovih različitih formi emocionalnih stresora smanjuje sekreciju VP-a u cirkulaciju, bez uticaja na nivo iRNK za VP, V1aR i V1bR u PVN-u. Ipak, ne možemo isključiti mogućnost da je hipertenzija indukovana stresom suprimirala oslobađanje VP-a. Takođe, ne treba zanemariti da opterećenje solju zatupljuje reaktivnost HPA ose na stres, i menja kardiovaskularni i bihevioralni odgovor [301].

Glavni nedostatak ove studije je odsustvo podataka o proteinskom nivou V1aR i V1bR u PVN-a WR-a i BHR-ova pod različitim eksperimentalnim uslovima. Većina istraživanja u mozgu je fokusirana na određivanje nivoa genskih transkripata za VR, koji predstavljaju indirektni pokazatelj proteinskog sadržaja V1aR i V1bR. Šta više, detekcija V1bR se pokazala kao teži zadatak usled niskog nivoa ekspresije, pa bi kvantitativna evaluacija bila nepouzdana [56,91]. Pošto nivo iRNK za ove receptore i nivo proteina ne moraju da se podudaraju, detekcija na proteinskom nivou je važna.

Dizajniranje i razvoj selektivnih liganada za ositocinski receptor (OTR) i VR predstavlja veliki izazov, usled visoke sličnosti samih receptora i njihovih prirodnih liganada [302]. VP i oksitocin (OT) pokazuju visok stepen preklapanja hemijske strukture (razlika je u svega dve aminokiseline), njihovi geni se nalaze u okviru istog genskog skupa i prepisuju se sa koplementarnih lanaca, pokazujući sličnu intron-egzon strukturu [303]. Postoji visok stepen poklapanja u primarnoj strukturi proteina između V1a i V1b izoformi VP receptora, ali i sa oksitocinskim receptorom (od 40-85% preklapanja) [304]. Zbog ovoga dolazi do značajnih unakrsnih reakcija između familije OT/VP receptora i liganada [305]. Takođe, ove receptore karakteriše i visokoočuvana homologija tokom evolucije između vrsta (čak i do 90% za određeni subtip receptora) [306]. Upravo ovako konzervativna struktura čini VP i oksitocinske receptore dobrim modelom za detaljno proučavanje funkcije GPCR, ali i predstavlja prepreku za njihovu detekciju, usled nedostatka visokoselektivnih radioliganada i antitela [49,91]. Nedostatak selektivnosti antitela za VR i OTR nije izuzetak, već pravilo za antitela usmerena protiv GPCR [307] i brojni izveštaji ne sugerišu detekciju GPCR-a na ovakav način [49,308,309]. Sledi da je ekspresija iRNK jedini pouzdan način za procenu GPCR, što je pristup koji je korišćen i u ovim eksperimentima za određivanje nivoa genske ekspresije V1aR i V1bR u PVN-u.

Gustina V1aR i V1bR na površini ćelije je dinamična i menja se pod različitim fiziološkim uslovima, usled promene ekspresije gena ili internalizacije receptora. Čak i male mutacione promene u promotoru gena za receptore ili u bilo kojoj komponenti transkripcione mašinerije mogu voditi redistribuciji receptora u mozgu, što za posledicu ima promene u ponašanju i

neuroendokrinim karakteristikama [96]. Stimulacija receptora agonistom vodi njegovoj fosforilizaciji i posledičnoj desenzitizaciji i internalizaciji, koja je posredovana β -arestinom ili vezikulama zaogrnutim klatrinom [310–313]. Međutim to ne mora biti kraj aktivnosti receptora. Internalizovani receptori mogu imati razičitu sudbinu i podleći degradaciji ili recikliranju. Degradacija je posredovana endozomsko lizozomskim sistemom, što smanjuje nivo proteina i vrlo je česta kod V2R [314]. Ipak, receptori mogu “pobeći” iz kasnog endozomsko/lizozomskog sistema i vratiti se na površinu u plazma membranu ćelije, bez uticaja na nivo proteina [315,316]. Za V1aR je pokazano da se brzo recikliraju, a za V1bR da su dominantno locirani u citoplazmi (sekvestracija), čak i kad nisu stimulisani, bez degradacije nakon internalizacije [53,317]. Dakle, sa velikom verovatnoćom može se zaključiti da količina iRNK za V1aR i V1bR izmerena u ovim eksperimentima predstavlja odraz ravnotežnog stanja i jasno oslikava nivo receptora u ćeliji.

6. ZAKLJUČCI

1. Ova studija je po prvi put pokazala da je povećana ekspresija gena za VP i V1bR u PVN-u fenotipska/ konstitutivna odlika granične hipertenzije kod pacova, kao i da je ekspresija V1aR uporediva između WR i BHR soja. Porast ekspresije VP-a i V1bR u PVN-u ne menja neurogenu kontrolu cirkulacije kod BHR-ova pod bazalnim uslovima. S druge strane uočen je porast VP-a u plazmi, koji istovremeno može da uveća periferni otpor i BRS (koji se protivi porastu BP-a). Takođe, BHR-ovi pod bazalnim uslovima imaju više vrednosti SP-a i OR-a BRR-a. Sveukupno, ovo bi mogli biti mehanizmi koji održavaju krvni pritisak u granično-hipertenzivnim vrednostima.
2. Opterećenje solju kod BHR-ova nije prouzrokovalo hipertenziju i smanjilo je ekspresiju gena za V1bR u PVN-u, što bi moglo da dovede do umanjenja renalne simpatičke aktivnosti, koje bi omogućilo efikasnu natriurezu, sprečavajući razvoj arterijske hipertenzije. Kod BHR-ova pod opterećenjem solju nije došlo do promene ekspresije V1aR u PVN-u, koji su glavni medijatori simpatičkog pražnjenja ka srcu i krvnim sudovima, što je podudarno sa smanjenjem LF BP-a i HR-a uočenom u ovim eksperimentima. Kada se opterećenju solju doda i izlaganje stresu, dolazi do povećavanja simpatičkog pražnjenja ka krvnim sudovima i srcu, što indukuje hipertenziju. Istovremeno, koncentracija VP-a u plazmi se smanjuje bez promene ekspresija gena za VP, V1aR i V1bR. Ovaj nalaz sugeriše da VP iz cirkulacije nema ulogu u nastanku hipertenzije indukovane stresom kod BHR-ova.
3. Rezultati ovog istraživanja sugerišu da je nastanak izražene hipertenzije kod BHR-ova koji su bili pod opterećenjem solju i izlagani stresu, praćen povećanjem simpatičkog pražnjenja prema arteriolama i srcu i nije povezan sa promenama ekspresije gena za VP, V1aR i V1bR u PVN-u i koncentracije VP-a u cirkulaciji.

7. LITERATURA

1. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. *Circulation*. 2000. pp. 329–335.
2. Japundžić-Žigon N, Lozić M, Šarenac O, Murphy D. Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18: 14–33.
3. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National Institutes of Health (U.S.), Lenfant C, National Heart, Lung and Blood Institute. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. International Medical Pub; 1997.
4. Elliott WJ. Global Burden of Hypertension: Analysis of Worldwide Data. *Yearbook of Cardiology*. 2006. pp. 4–5.
5. Hypertension. [cited 15 Dec 2020]. Available: https://www.who.int/health-topics/hypertension/#tab=tab_1
6. Center for Drug Evaluation, Research. High Blood Pressure–Understanding the Silent Killer. 12 Aug 2020 [cited 15 Dec 2020]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/special-features/high-blood-pressure-understanding-silent-killer>
7. Feldman RD, Zou GY, Vandervoort MK, Wong CJ, Nelson SAE, Feagan BG. A simplified approach to the treatment of uncomplicated hypertension: a cluster randomized, controlled trial. *Hypertension*. 2009;53: 646–653.
8. Abstracts from 2020 national congress of the Italian Society of Hypertension (SIIA). *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2020;27: 421–492.
9. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*. 1988. pp. 319–328.
10. Sever PS, Poulter NR. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens*. 1989;7: S9–S12.
11. Grassi G, Ram VS. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2016;10: 457–466.
12. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell*. 1992. pp. 169–180.
13. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, et al. Haplotypes of Angiotensinogen in Essential Hypertension. *The American Journal of Human Genetics*. 1997. pp. 1448–1460.
14. Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Hasstedt SJ, Wu LL, Lalouel JM. Tabulations and expectations regarding the genetics of human hypertension. *Kidney Int Suppl*. 1994;44: S57–64.
15. Lifton RP. Molecular Genetics of Human Blood Pressure Variation. *Science*. 1996. pp. 676–680.

16. Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995. pp. 8545–8551.
17. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension*. 1999;34: 724–728.
18. Stocker SD, Kinsman BJ, Sved AF. *Recent Advances in Neurogenic Hypertension: Dietary Salt, Obesity, and Inflammation*. *Hypertension*. 2017.
19. Grassi G, Mark A, Esler M. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circulation Research*. 2015. pp. 976–990.
20. Jackiewicz E, Szczepanska-Sadowska E, Dobruch J. Altered expression of angiotensin AT1a and vasopressin V1a receptors and nitric oxide synthase mRNA in the brain of rats with renovascular hypertension. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55: 725–737.
21. Berecek KH, Webb RL, Brody MJ. Evidence for a central role for vasopressin in cardiovascular regulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1983. pp. H852–H859.
22. Pittman QJ, Bagdan B. Chapter 11: Vasopressin involvement in central control of blood pressure. *Progress in Brain Research*. 1992. pp. 69–74.
23. Mann SJ. Neurogenic essential hypertension revisited: the case for increased clinical and research attention. *Am J Hypertens*. 2003;16: 881–888.
24. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7: 335–346.
25. Lohmeier TE, Dwyer TM, Irwin ED, Rossing MA, Kieval RS. Prolonged Activation of the Baroreflex Abolishes Obesity-Induced Hypertension. *Hypertension*. 2007. pp. 1307–1314.
26. Salman IM. Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function. *Current Hypertension Reports*. 2016.
27. Durocher JJ, Klein JC, Carter JR. Attenuation of sympathetic baroreflex sensitivity during the onset of acute mental stress in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300: H1788–93.
28. Floras JS, Ponikowski P. The sympathetic/parasympathetic imbalance in heart failure with reduced ejection fraction. *Eur Heart J*. 2015;36: 1974–82b.
29. Miyajima E, Yamada Y, Yoshida Y, Matsukawa T, Shionoiri H, Tochikubo O, et al. Muscle sympathetic nerve activity in renovascular hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension*. 1991;17: 1057–1062.
30. DiBona GF. Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension*. 2013;61: 556–560.
31. Egan B, Julius S. Borderline hypertension. *Prim Care*. 1983;10: 99–113.
32. Larkin KT. *Stress and Hypertension: Examining the Relation between Psychological Stress and High Blood Pressure*. Yale University Press; 2008.

33. Lawler JE, Cox RH. The borderline hypertensive rat (BHR): a new model for the study of environmental factors in the development of hypertension. *Pavlov J Biol Sci.* 1985;20: 101–115.
34. Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Blood Press.* 2009;18: 308–347.
35. Sanders BJ, Lawler JE. The borderline hypertensive rat (BHR) as a model for environmentally-induced hypertension: a review and update. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992;16: 207–217.
36. Sanders BJ, Cox RH, Lawler JE. Cardiovascular and renal responses to stress in borderline hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1988;255: R431–8.
37. Lawler JE, Sanders BJ, Cox RH, O'Connor EF. Baroreflex function in chronically stressed borderline hypertensive rats. *Physiology & Behavior.* 1991. pp. 539–542.
38. Koshimizu T-A, Nasa Y, Tanoue A, Oikawa R, Kawahara Y, Kiyono Y, et al. V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 7807–7812.
39. Crofton JT, Share L, Shade RE, Allen C, Tarnowski D. Vasopressin in the rat with spontaneous hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1978. pp. H361–H366.
40. Lo M, Julien C, Barres C, Medeiros I, Allevard AM, Vincent M, et al. Blood pressure maintenance in hypertensive sympathectomized rats. II. Renin-angiotensin system and vasopressin. *Am J Physiol.* 1991;261: R1052–6.
41. Johnston CI. Vasopressin in circulatory control and hypertension. *J Hypertens.* 1985;3: 557–569.
42. Mohring J, Kintz J, Schoun J, Robert McNeill J. Pressor Responsiveness and Cardiovascular Reflex Activity in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats During Vasopressin Infusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1981. pp. 948–957.
43. Swords BH, Michael Wyss J, Berecek KH. Central vasopressin receptors are upregulated by deoxycorticosterone acetate. *Brain Research.* 1991. pp. 10–16.
44. Yi SS, Kim H-J, Do S-G, Lee Y-B, Ahn HJ, Hwang IK, et al. Arginine vasopressin (AVP) expressional changes in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Anatomy & Cell Biology.* 2012. p. 114.
45. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2012.
46. Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, Gainer H. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiol Rev.* 2001;81: 1197–1267.
47. Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *Journal of Endocrinology.* 1998. pp. 223–229.

48. Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M. Chapter 14 Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Vasopressin and Oxytocin: From Genes to Clinical Applications*. 2002. pp. 179–196.
49. Koshimizu T-A, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev*. 2012;92: 1813–1864.
50. Birnbaumer M. Vasopressin Receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2000. pp. 406–410.
51. Aoyagi T, Koshimizu T-A, Tanoue A. Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. *Kidney Int*. 2009;76: 1035–1039.
52. Briley EM, Lolait SJ, Axelrod J, Felder CC. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. *Neuropeptides*. 1994;27: 63–74.
53. Innamorati G, Sadeghi H, Birnbaumer M. Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem*. 1998;273: 7155–7161.
54. Ripoll GV, Pifano M, Garona J, Alonso DF. Commentary: Arginine vasopressin receptor 1a is a therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Frontiers in oncology*. 2019. p. 1490.
55. Orloff J, Handler J. The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone. *The American Journal of Medicine*. 1967. pp. 757–768.
56. Roper J, O'Carroll A-M, Young W 3rd, Lolait S. The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress*. 2011;14: 98–115.
57. Mileva-Seitz V, Steiner M, Atkinson L, Meaney MJ, Levitan R, Kennedy JL, et al. Interaction between Oxytocin Genotypes and Early Experience Predicts Quality of Mothering and Postpartum Mood. *PLoS ONE*. 2013. p. e61443.
58. Burbach JP, Van Tol HH, Bakkus MH, Schmale H, Ivell R. Quantitation of vasopressin mRNA and oxytocin mRNA in hypothalamic nuclei by solution hybridization assays. *J Neurochem*. 1986;47: 1814–1821.
59. Benarroch EE. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clinical Autonomic Research*. 2005. pp. 254–263.
60. Pyner S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat*. 2009;38: 197–208.
61. Swanson LW. Mapping the human brain: past, present, and future. *Trends in Neurosciences*. 1995. pp. 471–474.
62. Badoer E. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: The Hypothalamus Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2001. pp. 95–99.
63. Swanson LW, H G J. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic

subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *The Journal of Comparative Neurology*. 1980. pp. 555–570.

64. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*. 1983;6: 269–324.
65. Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*. 1982;205: 260–272.
66. Sladek CD, Michelini LC, Stachenfeld NS, Stern JE, Urban JH. Endocrine-Autonomic Linkages. *Compr Physiol*. 2015;5: 1281–1323.
67. Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, et al. Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. *Neuron*. 2013;78: 1036–1049.
68. Stern JE, Filosa JA. Bidirectional neuro-glial signaling modalities in the hypothalamus: role in neurohumoral regulation. *Auton Neurosci*. 2013;175: 51–60.
69. Nordmann JJ, Morris JF. Method for quantitating the molecular content of a subcellular organelle: hormone and neurophysin content of newly formed and aged neurosecretory granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81: 180–184.
70. Altura BM, Altura BT. Actions of vasopressin, oxytocin, and synthetic analogs on vascular smooth muscle. *Fed Proc*. 1984;43: 80–86.
71. Bankir L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res*. 2001;51: 372–390.
72. Abboud FM, Floras JS, Aylward PE, Guo GB, Gupta BN, Schmid PG. Role of Vasopressin in Cardiovascular and Blood Pressure Regulation. *Journal of Vascular Research*. 1990. pp. 106–115.
73. Hirsch AT, Dzau VJ, Majzoub JA, Creager MA. Vasopressin-mediated forearm vasodilation in normal humans. Evidence for a vascular vasopressin V2 receptor. *J Clin Invest*. 1989;84: 418–426.
74. Aki Y, Tamaki T, Kiyomoto H, He H, Yoshida H, Iwao H, et al. Nitric oxide may participate in V2 vasopressin-receptor-mediated renal vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;23: 331–336.
75. Russ RD, Walker BR. Role of nitric oxide in vasopressinergic pulmonary vasodilatation. *Am J Physiol*. 1992;262: H743–7.
76. Bharati K, Prashanth U. Von willebrand disease: An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011. p. 7.
77. Itzhar-Baikian N, Boisseau P, Joly B, Veyradier A. Updated overview on von Willebrand disease: focus on the interest of genotyping. *Expert Rev Hematol*. 2019;12: 1023–1036.
78. Serradeil-Le Gal C, Wagnon J 3rd, Tonnerre B, Roux R, Garcia G, Griebel G, et al. An overview

of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V(1b) receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS Drug Rev.* 2005;11: 53–68.

79. Eugenín EA, González H, Sáez CG, Sáez JC. Gap junctional communication coordinates vasopressin-induced glycogenolysis in rat hepatocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 1998. pp. G1109–G1116.
80. Mancinelli R, Franchitto A, Glaser S, Vetuschi A, Venter J, Sferra R, et al. Vasopressin regulates the growth of the biliary epithelium in polycystic liver disease. *Lab Invest.* 2016;96: 1147–1155.
81. Knepper MA. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 1997. pp. F3–F12.
82. Wilson JLL, Miranda CA, Knepper MA. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin Exp Nephrol.* 2013;17: 751–764.
83. Jung HJ, Kwon T-H. Molecular mechanisms regulating aquaporin-2 in kidney collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311: F1318–F1328.
84. Imbert M, Chabardes D, Montegut M, Clique A, Morel F. Vasopressin dependent adenylate cyclase in single segments of rabbit kidney tubule. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* 1975. pp. 173–186.
85. Gordan R, Gwathmey JK, Xie L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol.* 2015;7: 204–214.
86. Moos F, Gouzènes L, Brown D, Dayanithi G, Sabatier N, Boissin L, et al. New aspects of firing pattern autocontrol in oxytocin and vasopressin neurones. *Adv Exp Med Biol.* 1998;449: 153–162.
87. Neumann I, Russell JA, Landgraf R. Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience.* 1993;53: 65–75.
88. Scala-Guenot DD, Di Scala-Guenot D, Strosser MT, Richard P. Electrical stimulations of perfused magnocellular nuclei in vitro elicit Ca²⁺-dependent, tetrodotoxin-insensitive release of oxytocin and vasopressin. *Neuroscience Letters.* 1987. pp. 209–214.
89. Pow DV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience.* 1989;32: 435–439.
90. Ludwig M, Callahan MF, Morris M. Effects of tetrodotoxin on osmotically stimulated central and peripheral vasopressin and oxytocin release. *Neuroendocrinology.* 1995;62: 619–627.
91. Hurbin A, Orcel H, Alonso G, Moos F, Rabié A. The vasopressin receptors colocalize with vasopressin in the magnocellular neurons of the rat supraoptic nucleus and are modulated by water balance. *Endocrinology.* 2002;143: 456–466.
92. Hurbin A, Boissin-Agasse L, Orcel H, Rabié A, Joux N, Desarménien MG, et al. The V1a and V1b, but not V2, vasopressin receptor genes are expressed in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, and the transcripts are essentially colocalized in the vasopressinergic

magnocellular neurons. *Endocrinology*. 1998;139: 4701–4707.

93. Kendrick KM, Da Costa APC, Broad KD, Ohkura S, Guevara R, Lévy F, et al. Neural Control of Maternal Behaviour and Olfactory Recognition of Offspring. *Brain Research Bulletin*. 1997. pp. 383–395.
94. Landry M, Vila-Porcile E, Hökfelt T, Calas A. Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *Eur J Neurosci*. 2003;17: 579–589.
95. Ma D, Morris JF. Protein synthetic machinery in the dendrites of the magnocellular neurosecretory neurons of wild-type Long-Evans and homozygous Brattleboro rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2002. pp. 171–186.
96. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2004. pp. 150–176.
97. Wotjak CT, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelmann M. Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci*. 2001;13: 2273–2281.
98. Shibuya I, Noguchi J, Tanaka K, Harayama N, Inoue Y, Kabashima N, et al. PACAP Increases the Cytosolic Ca²⁺-/ Concentration and Stimulates Somatodendritic Vasopressin Release in Rat Supraoptic Neurons. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008. pp. 31–42.
99. Ludwig M, Stern J. Multiple signalling modalities mediated by dendritic exocytosis of oxytocin and vasopressin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370.
100. Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, Leng G. Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature*. 2002;418: 85–89.
101. Tobin VA, Hurst G, Norrie L, Dal Rio FP, Bull PM, Ludwig M. Thapsigargin-induced mobilization of dendritic dense-cored vesicles in rat supraoptic neurons. *Eur J Neurosci*. 2004;19: 2909–2912.
102. Leng G, Brown C, Sabatier N, Scott V. Population dynamics in vasopressin cells. *Neuroendocrinology*. 2008;88: 160–172.
103. Gouzènes L, Desarménien MG, Hussy N, Richard P, Moos FC. Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons. *J Neurosci*. 1998;18: 1879–1885.
104. Poulain DA, Wakerley JB. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience*. 1982;7: 773–808.
105. Armstrong WE. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol*. 1995;47: 291–339.
106. Hussy N, Deleuze C, Desarménien MG, Moos FC. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol*. 2000;62: 113–134.

107. Ludwig M, Leng G. Autoinhibition of supraoptic nucleus vasopressin neurons in vivo: a combined retrodialysis/electrophysiological study in rats. *Eur J Neurosci.* 1997;9: 2532–2540.
108. Leng G, Mason WT. Influence of vasopressin upon firing patterns of supraoptic neurons: a comparison of normal and Brattleboro rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;394: 153–158.
109. Inenaga K, Yamashita H. Excitation of neurones in the rat paraventricular nucleus in vitro by vasopressin and oxytocin. *The Journal of Physiology.* 1986. pp. 165–180.
110. Dayanithi G, Sabatier N, Widmer H. Intracellular calcium signalling in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus: understanding the autoregulatory mechanisms. *Exp Physiol.* 2000;85 Spec No: 75S–84S.
111. Carette B, Poulain P. Vasopressin-sensitive neurons in the lateral paraventricular nucleus area in a guinea pig slice preparation. *Brain Res Bull.* 1989;22: 969–974.
112. Young WS, Li J, Wersinger SR, Palkovits M. The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience.* 2006;143: 1031–1039.
113. Koob GF, Bloom FE. Behavioral effects of neuropeptides: endorphins and vasopressin. *Annu Rev Physiol.* 1982;44: 571–582.
114. Hasser EM, Bishop VS, Hay M. Interactions Between Vasopressin And Baroreflex Control Of The Sympathetic Nervous System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 1997. pp. 102–108.
115. Rivier C, Vale W. Interaction of Corticotropin-Releasing Factor and Arginine Vasopressin on Adrenocorticotropin Secretion in Vivo. *Endocrinology.* 1983. pp. 939–942. 116. Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL, et al. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res.* 1996;107: 201–222.
117. Whitnall MH, Mezey É, Gainer H. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. *Nature.* 1985. pp. 248–250.
118. Aguilera G. Regulation of Pituitary ACTH Secretion during Chronic Stress. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1994. pp. 321–350.
119. Amaya F, Tanaka M, Hayashi S, Tanaka Y, Ibata Y. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis sensitization after chronic salt loading. *Neuroendocrinology.* 2001;73: 185–193.
120. Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 6370–6375.
121. Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JP. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology.* 2001;142: 1659–1668.
122. Dampney RA, Michelini LC, Li D-P, Pan H-L. Regulation of sympathetic vasomotor

activity by the hypothalamic paraventricular nucleus in normotensive and hypertensive states. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315: H1200–H1214.

123. Stern JE. Electrophysiological and morphological properties of pre-autonomic neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Physiol*. 2001;537: 161–177.
124. Coote JH, Yang Z, Pyner S, Deering J. Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25: 461–463.
125. Portillo F, Carrasco M, Vallo JJ. Separate populations of neurons within the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat project to vagal and thoracic autonomic preganglionic levels and express c-Fos protein induced by lithium chloride. *J Chem Neuroanat*. 1998;14: 95–102.
126. Coote JH. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Experimental Physiology*. 2005. pp. 169–173.
127. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Research*. 1989. pp. 156–162.
128. Saper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Research*. 1976. pp. 305–312.
129. Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, Loewy AD. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labelling with pseudorabies virus. *Brain Research*. 1989. pp. 274–296.
130. Ranson RN, Motawei K, Pyner S, Coote JH. The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion. *Exp Brain Res*. 1998;120: 164–172.
131. Motawei K, Pyner S, Ranson RN, Kamel M, Coote JH. Terminals of paraventricular spinal neurones are closely associated with adrenal medullary sympathetic preganglionic neurones: immunocytochemical evidence for vasopressin as a possible neurotransmitter in this pathway. *Exp Brain Res*. 1999;126: 68–76.
132. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994;74: 323–364.
133. Hallbeck M, Blomqvist A. Spinal cord-projecting vasopressinergic neurons in the rat paraventricular hypothalamus. *J Comp Neurol*. 1999;411: 201–211.
134. Sermasi E, Howl J, Wheatley M, Coote JH. Localisation of arginine vasopressin V_{1a} receptors on sympatho-adrenal preganglionic neurones. *Experimental Brain Research*. 1998. pp. 85–91.
135. Yang Z, Wheatley M, Coote JH. Neuropeptides, Amines and Amino Acids as Mediators of the Sympathetic Effects of Paraventricular Nucleus Activation in the Rat. *Experimental Physiology*. 2002. pp. 663–674.
136. Szczepanska-Sadowska E. Role of neuropeptides in central control of cardiovascular

- responses to stress. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 8: 61–89.
137. Leng G, Brown CH, Russell JA. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol.* 1999;57: 625–655.
 138. Qin C, Li J, Tang K. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology.* 2018;159: 3458–3472.
 139. Ribeiro N, Panizza H do N, Santos KMD, Ferreira-Neto HC, Antunes VR. Salt-induced sympathoexcitation involves vasopressin V1a receptor activation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309: R1369–79.
 140. Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9: 519–531.
 141. Toney GM, Stocker SD. Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease. *J Physiol.* 2010;588: 3375–3384.
 142. Arima, Arima, Kondo, Kakiya, Nagasaki, Yokoi, et al. Rapid and Sensitive Vasopressin Heteronuclear RNA Responses to Changes in Plasma Osmolality. *Journal of Neuroendocrinology.* 1999. pp. 337–341.
 143. Voisin DL, Bourque CW. Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. *Trends Neurosci.* 2002;25: 199–205.
 144. McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D, et al. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28: 990–992.
 145. Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci.* 1991;14: 406–411.
 146. Leng G, Blackburn RE, Dyball REJ, Russell JA. Role of Anterior Peri-Third Ventricular Structures in the Regulation of Supraoptic Neuronal Activity and Neurohypophysial Hormone Secretion in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology.* 1989. pp. 35–46.
 147. Ferguson AV, Bains JS, Lowes VL. Circumventricular Organs and Cardiovascular Homeostasis. *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation.* 1992. pp. 80–101.
 148. Leng G, Brown CH, Bull PM, Brown D, Scullion S, Currie J, et al. Responses of Magnocellular Neurons to Osmotic Stimulation Involves Coactivation of Excitatory and Inhibitory Input: An Experimental and Theoretical Analysis. *The Journal of Neuroscience.* 2001. pp. 6967–6977.
 149. Kim JS, Kim WB, Kim Y-B, Lee Y, Kim YS, Shen F-Y, et al. Chronic hyperosmotic stress converts GABAergic inhibition into excitation in vasopressin and oxytocin neurons in the rat. *J Neurosci.* 2011;31: 13312–13322.
 150. Brimble MJ, Dyball RE. Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *J Physiol.* 1977;271: 253–271.

151. Poulain DA, Wakerley JB, Dyball RE. Electrophysiological differentiation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1977;196: 367–384.
152. Wakerley JB, Poulain DA, Brown D. Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. *Brain Res.* 1978;148: 425–440.
153. Dyball RE, Garten LL. Stimulus-related changes in the dendrites of magnocellular neurones. *Brain Res Bull.* 1988;20: 675–680.
154. Oliet SH, Bourque CW. Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. *Am J Physiol.* 1993;265: R1475–9.
155. Oliet SH, Bourque CW. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature.* 1993;364: 341–343.
156. Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarménien MG, Moos F. Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol.* 1997;502 (Pt 3): 609–621.
157. Mason WT. Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature.* 1980;287: 154–157.
158. Zhu L, Onaka T. Involvement of medullary A2 noradrenergic neurons in the activation of oxytocin neurons after conditioned fear stimuli. *Eur J Neurosci.* 2002;16: 2186–2198.
159. Matsuguchi H, Schmid PG. Pressor response to vasopressin and impaired baroreflex function in DOC-salt hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1982. pp. H44–H49.
160. Su DF, Cerutti C, Barres C, Vincent M, Sassard J. Blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious hypertensive rats of Lyon strain. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1986. pp. H1111–H1117.
161. Brotman DJ, Golden SH, Wittstein IS. The cardiovascular toll of stress. *The Lancet.* 2007. pp. 1089–1100.
162. Julien C. Mental stress, hypertension and the baroreflex: what's new? *Journal of Hypertension.* 2009. pp. 31–33.
163. Dampney RAL. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv Physiol Educ.* 2016;40: 283–296.
164. Dampney RAL. Resetting of the Baroreflex Control of Sympathetic Vasomotor Activity during Natural Behaviors: Description and Conceptual Model of Central Mechanisms. *Front Neurosci.* 2017;11: 461.
165. Mancia G, Grassi G. Baroreceptor Control of the Circulation in Man. An Update. *Clinical and Experimental Hypertension.* 1995. pp. 387–397.
166. Lanfranchi PA, Somers VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283: R815–26.

167. Wallin BG, Charkoudian N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. *Muscle Nerve*. 2007;36: 595–614.
168. Raven PB, Fadel PJ, Ogoh S. Arterial baroreflex resetting during exercise: a current perspective. *Exp Physiol*. 2006;91: 37–49.
169. Bisset GW, Chowdrey HS. Control Of Release Of Vasopressin By Neuroendocrine Reflexes. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1988. pp. 811–872.
170. Jhamandas JH, Renaud LP. Neurophysiology of a central baroreceptor pathway projecting to hypothalamic vasopressin neurons. *Can J Neurol Sci*. 1987;14: 17–24.
171. Yang Z, Coote JH. Role of GABA and NO in the paraventricular nucleus-mediated reflex inhibition of renal sympathetic nerve activity following stimulation of right atrial receptors in the rat. *Exp Physiol*. 2003;88: 335–342.
172. Hjemdahl P. Stress and the metabolic syndrome: an interesting but enigmatic association. *Circulation*. 2002. pp. 2634–2636.
173. Rosmond R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30: 1–10.
174. Herman JP, -F. Prewitt CM, Cullinan WE. Neuronal Circuit Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Stress Axis. *Critical Reviews™ in Neurobiology*. 1996. pp. 371–394.
175. Landgraf R, Wotjak CT, Neumann ID, Engelmann M. Release of vasopressin within the brain contributes to neuroendocrine and behavioral regulation. *Progress in Brain Research*. 1999. pp. 201–220.
176. Milik E, Szczepanska-Sadowska E, Dobruch J, Cudnoch-Jedrzejewska A, Maslinski W. Altered expression of V1a receptors mRNA in the brain and kidney after myocardial infarction and chronic stress. *Neuropeptides*. 2014;48: 257–266.
177. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study. *Neuroendocrinology*. 1983. pp. 165–186.
178. Goeij DCE de, de Goeij DCE, Jezova D, Tilders FJH. Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Research*. 1992. pp. 165–168.
179. Whitnall MH. Stress Selectively Activates the Vasopressin-Containing Subset of Corticotropin-Releasing Hormone Neurons. *Neuroendocrinology*. 1989. pp. 702–707.
180. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24: 151–180.
181. Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res*. 2000;122: 61–78.

182. Jedema HP. Corticotropin-Releasing Hormone Directly Activates Noradrenergic Neurons of the Locus Ceruleus Recorded In Vitro. *Journal of Neuroscience*. 2004. pp. 9703–9713.
183. Pacák K, Baffi JS, Kvetňanský R, Goldstein DS, Palkovits M. Stressor-Specific Activation of Catecholaminergic Systems: Implications for Stress-Related Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Responses. *Advances in Pharmacology*. 1997. pp. 561–564.
184. Gok-Yurtseven D, Kafa IM, Minbay Z, Eyigor O. Glutamatergic activation of A1 and A2 noradrenergic neurons in the rat brain stem. *Croat Med J*. 2019;60: 352–360.
185. Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M. Neuroendocrine and behavioral response to social confrontation: residents versus intruders, active versus passive coping styles. *Horm Behav*. 2005;47: 14–21.
186. Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, et al. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *J Neurosci*. 1996;16: 7725–7732.
187. Wotjak CT, Ludwig M, Ebner K, Russell JA, Singewald N, Landgraf R, et al. Vasopressin from hypothalamic magnocellular neurons has opposite actions at the adenohypophysis and in the supraoptic nucleus on ACTH secretion. *Eur J Neurosci*. 2002;16: 477–485.
188. Engelmann M, Ludwig M, Landgraf R. Simultaneous Monitoring of Intracerebral Release and Behavior: Endogenous Vasopressin Improves Social Recognition. *Journal of Neuroendocrinology*. 1994. pp. 391–395.
189. Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R. Direct osmotic stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus by microdialysis induces excessive grooming in the rat. *Behav Brain Res*. 1994;63: 221–225.
190. Brown DR, Li SG, Lawler JE, Randall DC. Sympathetic control of BP and BP variability in borderline hypertensive rats on high- vs. low-salt diet. *Am J Physiol*. 1999;277: R650–7.
191. Savić B, Martin A, Mecawi AS, Bukumirić Z, Antunes-Rodrigues J, Murphy D, et al. Vasopressin and v1br gene expression is increased in the hypothalamic pvn of borderline hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2020;43: 1165–1174.
192. Šarenac O, Lozić M, Drakulić S, Bajić D, Paton JF, Murphy D, et al. Autonomic mechanisms underpinning the stress response in borderline hypertensive rats. *Exp Physiol*. 2011;96: 574–589.
193. Ledvényiová-Farkašová V, Bernátová I, Balis P, Puzserova A, Barteková M, Gablovsky I, et al. Effect of crowding stress on tolerance to ischemia-reperfusion injury in young male and female hypertensive rats: molecular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93: 793–802.
194. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojcic MB. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology*. 2012;66: 112–119.
195. Stojčić S, Milutinović S, Sarenac O, Zivković S, Japundžić-Zigon N. Central vasopressin V(1a) and V(1b) receptors modulate the cardiovascular response to air-jet stress in

conscious rats. *Biomed Tech* . 2006;51: 268–271.

196. Sequeira-Cordero A, Salas-Bastos A, Fornaguera J, Brenes JC. Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. *Sci Rep*. 2019;9: 17403.
197. Bajić D, Lončar-Turukalo T, Stojičić S, Šarenac O, Bojić T, Murphy D, et al. Temporal analysis of the spontaneous baroreceptor reflex during mild emotional stress in the rat. *Stress*. 2010. pp. 142–154.
198. Oosting J, Struijker-Boudier HAJ, Janssen BJA. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. *Journal of Hypertension*. 1997. pp. 391–399.
199. Waki H, Katahira K, Polson JW, Kasparov S, Murphy D, Paton JFR. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. *Exp Physiol*. 2006;91: 201–213.
200. Parati G, Ulian L, Santucci C, Omboni S, Mancia G. Blood pressure variability, cardiovascular risk and antihypertensive treatment. *Journal of Hypertension*. 1995. pp. S27–A34.
201. Malik M, Bigger JT, Camm AJ, Kleiger RE, Malliani A, Moss AJ, et al. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal*. 1996. pp. 354–381.
202. Japundzic-Zigon N. Physiological mechanisms in regulation of blood pressure fast frequency variations. *Clin Exp Hypertens*. 1998;20: 359–388.
203. Husain MK, Kazim Husain M, Fernando N, Shapiro M, Kagan A, Glick SM. Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1973. pp. 616–625.
204. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*. Academic Press; 2005.
205. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001. pp. 402–408.
206. Sofroniew MV, Weindl A. Projections from the parvocellular vasopressin- and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. *American Journal of Anatomy*. 1978. pp. 391–429.
207. Buijs RM. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell and Tissue Research*. 1978.
208. Nilaver G, Zimmerman EA, Wilkins J, Michaels J, Hoffman D, Silverman A-J. Magnocellular Hypothalamic Projections to the Lower Brain Stem and Spinal Cord of the Rat. *Neuroendocrinology*. 1980. pp. 150–158.
209. Lang RE, Ganten D, Ganten U, Rascher W, Unger T. Pathogenesis of hypertension in spontaneously hypertensive rats: definite evidence against a pressor role of vasopressin. *Clin Exp Hypertens A*. 1984;6: 121–138.

210. Cowley AW Jr, Szczepanska-Sadowska E, Stepniakowski K, Mattson D. Chronic intravenous administration of V1 arginine vasopressin agonist results in sustained hypertension. *Am J Physiol.* 1994;267: H751–6.
211. Szczepanska-Sadowska E, Stepniakowski K, Skelton MM, Cowley AW Jr. Prolonged stimulation of intrarenal V1 vasopressin receptors results in sustained hypertension. *Am J Physiol.* 1994;267: R1217–25.
212. Möhring J, Kintz J, Schoun J. Studies on the role of vasopressin in blood pressure control of spontaneously hypertensive rats with established hypertension (SHR, stroke-prone strain). *J Cardiovasc Pharmacol.* 1979;1: 593–608.
213. Rascher W, Lang RE, Unger T, Ganten D, Gross F. Vasopressin in brain of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1982. pp. H496–H499.
214. Lang RE, Rascher W, Unger T, Ganten D. Reduced content of vasopressin in the brain of spontaneously hypertensive as compared to normotensive rats. *Neuroscience Letters.* 1981. pp. 199–202.
215. Möhring J, Schoun J, Kintz J, McNeil R. Decreased vasopressin content in brain stem of rats with spontaneous hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1980;315: 83–84.
216. Morris M, Keller M, Sundberg DK. Changes in paraventricular vasopressin and oxytocin during the development of spontaneous hypertension. *Hypertension.* 1983;5: 476–481.
217. van Tol HH, van den Buuse M, de Jong W, Burbach JP. Vasopressin and oxytocin gene expression in the supraoptic and paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rat (SHR) during development of hypertension. *Brain Res.* 1988;464: 303–311.
218. Ciriello J, Kline RL, Zhang TX, Caverson MM. Lesions of the paraventricular nucleus alter the development of spontaneous hypertension in the rat. *Brain Res.* 1984;310: 355–359.
219. Szczepańska-Sadowska E, Paczwa P, Loń S, Ganten D. Increased pressor function of central vasopressinergic system in hypertensive renin transgenic rats. *J Hypertens.* 1998;16: 1505–1514.
220. Fujisawa Y, Miyatake A, Hayashida Y, Aki Y, Kimura S, Tamaki T, et al. Role of vasopressin on cardiovascular changes during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol.* 1994;267: H1713–8.
221. Imai Y, Kim C-Y, Hashimoto J, Minami N, Munakata M, Abe K. Role of Vasopressin in Neurocardiogenic Responses to Hemorrhage in Conscious Rats. *Hypertension.* 1996. pp. 136–143.
222. Rocha E Silva M Jr, Rosenberg M. The release of vasopressin in response to haemorrhage and its role in the mechanism of blood pressure regulation. *J Physiol.* 1969;202: 535–557.
223. Laycock JF, Penn W, Shirley DG, Walter SJ. The role of vasopressin in blood pressure regulation immediately following acute haemorrhage in the rat. *J Physiol.* 1979;296: 267–275.

224. Dayan AD. Book Reviews : Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics - Ninth Edition. Human & Experimental Toxicology. 1996. pp. 605–605.
225. Liard JF. Vasopressin in cardiovascular control: role of circulating vasopressin. *Clin Sci* . 1984;67: 473–481.
226. Montani JP, Liard JF, Schoun J, Möhring J. Hemodynamic effects of exogenous and endogenous vasopressin at low plasma concentrations in conscious dogs. *Circ Res*. 1980;47: 346–355.
227. Liard JF, Dériaz O, Schelling P, Thibonnier M. Cardiac output distribution during vasopressin infusion or dehydration in conscious dogs. *Am J Physiol*. 1982;243: H663–9.
228. Charocopos F, Hatzinikolaou P, North WG, Gavras H. Systemic and regional hemodynamic effects of endogenous vasopressin stimulation in rats. *Am J Physiol*. 1982;243: H560–5.
229. Pullan PT, Johnston CI, Anderson WP, Korner PI. Plasma vasopressin in blood pressure homeostasis and in experimental renal hypertension. *Am J Physiol*. 1980;239: H81–7.
230. Padfield PL, Brown JJ, Lever AF, Morton JJ, Robertson JJ. Changes of vasopressin in hypertension: Cause or effect? *Lancet*. 1976;1: 1255–1257.
231. Cowley AW Jr, Monos E, Guyton AC. Interaction of vasopressin and the baroreceptor reflex system in the regulation of arterial blood pressure in the dog. *Circ Res*. 1974;34: 505–514.
232. Brizzee BL, Walker BR. Vasopressinergic augmentation of cardiac baroreceptor reflex in conscious rats. *Am J Physiol*. 1990;258: R860–8.
233. Möhring J, Glänzer K, Maciel JA Jr, Düsing R, Kramer HJ, Arbogast R, et al. Greatly enhanced pressor response to antidiuretic hormone in patients with impaired cardiovascular reflexes due to idiopathic orthostatic hypotension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1980;2: 367–376.
234. Osborn JW Jr, Liard JF, Cowley AW Jr. Effect of AVP on pressor responses to peripheral sympathetic stimulation in the rat. *Am J Physiol*. 1987;252: H675–80.
235. Hasser EM, Bishop VS. Reflex effect of vasopressin after blockade of V1 receptors in the area postrema. *Circulation Research*. 1990. pp. 265–271.
236. Hasser EM, Bishop VS, Hay M. Interactions between vasopressin and baroreflex control of the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24: 102–108.
237. Imai Y, Nolan PL, Johnston CI. Restoration of suppressed baroreflex sensitivity in rats with hereditary diabetes insipidus (Brattleboro rats) by arginine-vasopressin and DDAVP. *Circ Res*. 1983;53: 140–149.
238. Shapiro RE, Miselis RR. The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol*. 1985;234: 344–364.
239. Leslie RA, Gwyn DG. Neuronal connections of the area postrema. *Fed Proc*. 1984;43: 2941–2943.

240. Phillips PA, Kelly JM, Abrahams JM, Grzonka Z, Paxinos G, Mendelsohn FAO, et al. Vasopressin receptors in rat brain and kidney. *Journal of Hypertension*. 1988. pp. S550–553.
241. Sampey DB, Burrell LM, Widdop RE. Vasopressin V2 receptor enhances gain of baroreflex in conscious spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1999. pp. R872–R879.
242. Imai Y, Nolan PL, Johnston CI. Endogenous vasopressin modulates the baroreflex sensitivity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1983. pp. 289–292.
243. Judy WV, Farrell SK. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1979. pp. 605–614.
244. Berlove DJ, Piekut DT. Co-localization of putative vasopressin receptors and vasopressinergic neurons in rat hypothalamus. *Histochemistry*. 1990;94: 653–657.
245. Abe H, Inoue M, Matsuo T, Ogata N. The effects of vasopressin on electrical activity in the guinea-pig supraoptic nucleus in vitro. *J Physiol*. 1983;337: 665–685.
246. Lozić M, Tasić T, Martin A, Greenwood M, Šarenac O, Hindmarch C, et al. Over-expression of V1A receptors in PVN modulates autonomic cardiovascular control. *Pharmacol Res*. 2016;114: 185–195.
247. Lombardi F. Clinical implications of present physiological understanding of HRV components. *Card Electrophysiol Rev*. 2002;6: 245–249.
248. Narkiewicz K, Grassi G. Impaired baroreflex sensitivity as a potential marker of cardiovascular risk in hypertension. *Journal of Hypertension*. 2008. pp. 1303–1304.
249. Janssen BJ, Oosting J, Slaaf DW, Persson PB, Struijker-Boudier HA. Hemodynamic basis of oscillations in systemic arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol*. 1995;269: H62–71.
250. Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ, Lo M, Julien C, Vincent M, et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol*. 1991;261: H1292–9.
251. Just A, Wittmann U, Nafz B, Wagner CD, Ehmke H, Kirchheim HR, et al. The blood pressure buffering capacity of nitric oxide by comparison to the baroreceptor reflex. *Am J Physiol*. 1994;267: H521–7.
252. Japundzić-Zigon N. An update on blood pressure short-term variability. *ScientificWorldJournal*. 2002;2: 320–323.
253. Japundzic N, Grichois ML, Zitoun P, Laude D, Elghozi JL. Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. *J Auton Nerv Syst*. 1990;30: 91–100.
254. Stauss HM, Kregel KC. Frequency response characteristic of sympathetic-mediated vasomotor waves in conscious rats. *Am J Physiol*. 1996;271: H1416–22.

255. Bertram D, Barres C, Cuisinaud G, Julien C. The arterial baroreceptor reflex of the rat exhibits positive feedback properties at the frequency of Mayer waves. *J Physiol.* 1998;513 (Pt 1): 251–261.
256. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science.* 1981;213: 220–222.
257. Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of humoral systems to the short-term variability of blood pressure after severe hemorrhage. *Am J Physiol.* 1997;273: R58–69.
258. Kanbar R, Oréa V, Barrès C, Julien C. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292: R362–7.
259. Hallbeck M, Larhammar D, Blomqvist A. Neuropeptide expression in rat paraventricular hypothalamic neurons that project to the spinal cord. *J Comp Neurol.* 2001;433: 222–238.
260. Geerling JC, Shin J-W, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol.* 2010;518: 1460–1499.
261. Sermasi E, Coote JH. Oxytocin acts at V1 receptors to excite sympathetic preganglionic neurones in neonate rat spinal cord in vitro. *Brain Research.* 1994. pp. 323–332.
262. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension.* 1995;25: 305–313.
263. Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC, Massie BM, Freis ED, Kochar MS, et al. Single-drug therapy for hypertension in men. A comparison of six antihypertensive agents with placebo. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *N Engl J Med.* 1993;328: 914–921.
264. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological Reviews.* 1982. pp. 347–504.
265. Simmonds SS, Lay J, Stocker SD. Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats. *Hypertension.* 2014;64: 583–589.
266. Johnson AK. The Sensory Psychobiology of Thirst and Salt Appetite. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 2007. pp. 1388–1400.
267. Miyajima E. Reduced sympathetic inhibition in salt-sensitive Japanese young adults. *American Journal of Hypertension.* 1999. pp. 1195–1200.
268. Lohmeier TE, Hildebrandt DA, Ashley Hood W. Renal Nerves Promote Sodium Excretion During Long-Term Increases in Salt Intake. *Hypertension.* 1999. pp. 487–492.
269. DiBona GF, Rios LL. Mechanism of exaggerated diuresis in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1978;235: 409–416.
270. DiBona GF, Sawin LL. Exaggerated natriuresis in experimental hypertension. *Proc Soc*

Exp Biol Med. 1986;182: 43–51.

271. Kapusta DR, Pascale CL, Kuwabara JT, Wainford RD. Central Nervous System G α i 2 - Subunit Proteins Maintain Salt Resistance via a Renal Nerve-Dependent Sympathoinhibitory Pathway. *Hypertension*. 2013. pp. 368–375.
272. Kapusta DR, Pascale CL, Wainford RD. Brain heterotrimeric G α i 2 -subunit protein-gated pathways mediate central sympathoinhibition to maintain fluid and electrolyte homeostasis during stress. *The FASEB Journal*. 2012. pp. 2776–2787.
273. Suzuki S, Takeshita A, Imaizumi T, Hirooka Y, Yoshida M, Ando S, et al. Central nervous system mechanisms involved in inhibition of renal sympathetic nerve activity induced by arginine vasopressin. *Circ Res*. 1989;65: 1390–1399.
274. DiBona GF, Jones SY. Renal manifestations of NaCl sensitivity in borderline hypertensive rats. *Hypertension*. 1991;17: 44–53.
275. DiBona GF, Jones SY. Cardiac volume receptor reflex in borderline hypertensive rats. *Hypertension*. 1993;21: 222–226.
276. El-Werfali W, Toomasian C, Maliszewska-Scislo M, Li C, Rossi NF. Haemodynamic and renal sympathetic responses to V1b vasopressin receptor activation within the paraventricular nucleus. *Exp Physiol*. 2015;100: 553–565.
277. Dampney RAL. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2015. pp. R429–R443.
278. Dampney RAL, Coleman MJ, Fontes MAP, Hirooka Y, Horiuchi J, Li Y-W, et al. Central Mechanisms Underlying Short- And Long-Term Regulation Of The Cardiovascular System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2002. pp. 261–268.
279. Stotz-Potter EH, Michelle Morin S, DiMicco JA. Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Research*. 1996. pp. 219–224.
280. Makino S, Hashimoto K, Gold PW. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002. pp. 147–158.
281. Carrive P, Gorissen M. Premotor sympathetic neurons of conditioned fear in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 2008. pp. 428–446.
282. Herman JP, Tasker JG. Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation. *Front Endocrinol* . 2016;7: 137.
283. Julien C, Malpas SC, Stauss HM. Sympathetic modulation of blood pressure variability. *J Hypertens*. 2001;19: 1707–1712.
284. Malliani A, Lombardi F, Pagani M, Cerutti S. Power Spectral Analysis of Cardiovascular Variability in Patients at Risk for Sudden Cardiac Death. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1994. pp. 274–286.

285. Lawler JE, Zheng G, Li S, Wang CH, Edgemon IP. Norepinephrine levels in discrete brain nuclei in borderline hypertensive rats exposed to compound stressors. *Brain Res Bull.* 1996;41: 87–92
286. DiBona GF, Jones SY. Acute environmental stress overrides cardiac volume receptor reflex in borderline hypertensive rats. *J Hypertens.* 1995;13: 63–68.
287. Koepke JP, DiBona GF. High sodium intake enhances renal nerve and antinatriuretic responses to stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1985;7: 357–363.
288. Koepke JP, Jones S, DiBona GF. Stress increases renal nerve activity and decreases sodium excretion in Dahl rats. *Hypertension.* 1988;11: 334–338.
289. Light KC, Koepke JP, Obrist PA, Willis PW 4th. Psychological stress induces sodium and fluid retention in men at high risk for hypertension. *Science.* 1983;220: 429–431.
290. Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog Brain Res.* 2008;170: 29–39.
291. Yoshii T, Sakamoto H, Kawasaki M, Ozawa H, Ueta Y, Onaka T, et al. The single-prolonged stress paradigm alters both the morphology and stress response of magnocellular vasopressin neurons. *Neuroscience.* 2008;156: 466–474.
292. Frank E, Landgraf R. The vasopressin system — From antidiuresis to psychopathology. *European Journal of Pharmacology.* 2008. pp. 226–242.
293. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology.* 2003. pp. 235–272.
294. Onaka T, Hamamura M, Yagi K. Potentiation of vasopressin secretion by footshocks in rats. *The Japanese Journal of Physiology.* 1986. pp. 1253–1260.
295. Wotjak CT, Ganster J, Kohl G, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: New insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience.* 1998. pp. 1209–1222.
296. Yagi K, Onaka T. Suppressive vasopressin response to emotional stress: the neuroactive substance that may be involved. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;689: 685–688.
297. Yamazato M, Ohya Y, Nakamoto M, Sakima A, Tagawa T, Harada Y, et al. Sympathetic hyperreactivity to air-jet stress in the chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus congenic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290: R709–14.
298. Henry JP, Liu YY, Nadra WE, Qian CG, Mormede P, Lemaire V, et al. Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. *Hypertension.* 1993;21: 714–723
299. Landgraf R, Szot P, Dorsa DM. Vasopressin receptors in the brain, liver and kidney of rats following osmotic stimulation. *Brain Res.* 1991;544: 287–290.
300. Landgraf R, Frank E, Aldag JM, Neumann ID, Sharer CA, Ren X, et al. Viral vector-mediated

gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour. *Eur J Neurosci.* 2003;18: 403–411.

301. Krause EG, Pati D, Frazier CJ. Chronic salt-loading reduces basal excitatory input to CRH neurons in the paraventricular nucleus and accelerates recovery from restraint stress in male mice. *Physiology & Behavior.* 2017. pp. 189–194.
302. Koehbach J, Stockner T, Bergmayr C, Muttenthaler M, Gruber CW. Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *Biochem Soc Trans.* 2013;41: 197–204.
303. Sausville E, Carney D, Battey J. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. *J Biol Chem.* 1985;260: 10236–10241.
304. Chini B, Manning M. Agonist selectivity in the oxytocin/vasopressin receptor family: new insights and challenges. *Biochem Soc Trans.* 2007;35: 737–741.
305. Pierce ML, French JA, Murray TF. Comparison of the pharmacological profiles of arginine vasopressin and oxytocin analogs at marmoset, macaque, and human vasopressin 1a receptor. *Biomed Pharmacother.* 2020;126: 110060.
306. Laycock JF. *Perspectives on Vasopressin.* World Scientific; 2010.
307. Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2009. pp. 385–388.
308. Gautron L. On the Necessity of Validating Antibodies in the Immunohistochemistry Literature. *Front Neuroanat.* 2019;13: 46.
309. Hamdani N, van der Velden J. Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009;379: 403–407.
310. Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Neuroscience.* 2001. pp. 727–733.
311. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of g protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual Review of Neuroscience.* 2004. pp. 107–144.
312. von Zastrow M, von Zastrow M, Williams JT. Modulating Neuromodulation by Receptor Membrane Traffic in the Endocytic Pathway. *Neuron.* 2012. pp. 22–32.
313. Innamorati G, Sadeghi HM, Tran NT, Birnbaumer M. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95: 2222–2226.
314. Tsao PI, von Zastrow M. Type-specific Sorting of G Protein-coupled Receptors after Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2000. pp. 11130–11140.
315. Bonifacino JS, Traub LM. Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annual Review of Biochemistry.* 2003. pp. 395–447.
316. Hicke L, Dunn R. Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-

Binding Proteins. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2003. pp. 141–172.

317. Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Koshimizu T-A. Subcellular localization and internalization of the vasopressin V1B receptor. *European Journal of Pharmacology*. 2015. pp. 291–299.

BIOGRAFIJA

Bojana D. Stevanović rođena je 15.05.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisuje 2006. godine. Diplomirala je aprila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9.48/10.

Od decembra 2013. godine do danas angažovana je kao istraživač-pripravnik na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na interdisciplinarnom projektu III 41013, Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj pod nazivom: Funkcionalna genomika hipotalamusa i medule u hipertenziji indukovanoj hroničnim stresom, pod rukovodstvom prof. dr Nine Japundžić Žigon.

Semptembra 2014. godine upisuje Doktorske akademске studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna medicina, pod mentorstvom prof. dr Nine Japundžić Žigon.

U periodu od septembra 2014. godine do danas učestvovala je na deset međunarodnih simpozijuma.

Odlukom veća naučnih oblasti medicinskih nauka od dana 20.07.2020. godine ima prihvaćenu tezu doktorske disertacije po naslovom: *Vazopresin i neurokardiogene karakteristike hiperadrenergičkog stanja kod granično hipertenzivnih pacova.*

Novembra 2020. godine unapređena je u zvanje istraživač-saradnik.

Bojana D. Stevanović položila je sve ispite predviđene planom i programom Doktorskih akademskih studija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za smer Molekularna medicina, sa prosečnom ocenom 9,6/10. Glavni rezultat njenog višegodišnjeg truda je i prvo autorstvo u radu objavljenom 2020. godine u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) – Hypertension Reserach pod nazivom: *Vasopressin and v1br gene expression is increased in the hypothalamic pvn of borderline hypertensive rats.* Hypertens Res. 2020 Nov;43(11):1165-1174.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: **Bojana Stevanović**

broj upisa: **MM 07/14**

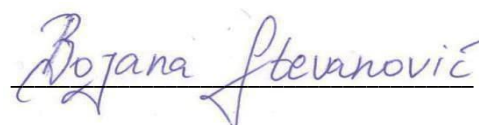
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: **VAZOPRESIN I NEUROKARDIOGENE KARAKTERISTIKE HIPERADRENERGIČKOG STANJA KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.03.2021.



Bojana Stevanović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Bojana Stevanović**

Broj upisa: MM 07/14

Studijski program: Doktorske akademske studije; Molekularna medicina

Naslov rada:

VAZOPRESIN I NEUROKARDIOGENE KARAKTERISTIKE HIPERADRENERGIČKOG STANJA KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA

Mentor: Prof. dr Nina Japundžić Žigon

Potpisana Bojana Stevanović

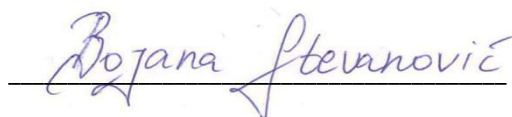
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.03.2021.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Bojana Stevanović', is written over a horizontal line.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: **VAZOPRESIN I NEUROKARDIOGENE KARAKTERISTIKE HIPERADRENERGIČKOG STANJA KOD GRANIČNO HIPERTENZIVNIH PACOVA** koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.03.2021.

Bojana Stevanović