

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mr dr Sanja M. Milutinović - Smiljanić

**Uloga centralnih  $V_2$  vazopresinskih receptora u  
kardiovaskularnoj homeostazi**

doktorska disertacija

Beograd, 2013. god.

## **Podaci o mentoru i članovima komisije**

Mentor doktorske disertacije pod nazivom „Uloga centralnih V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u kardiovaskularnoj homeostazi“ dr Sanje Milutinović-Smiljanić je prof.dr Nina Žigon (Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu). Komentor je prof.dr Gordana Kuburović (Opšta i oralna histologija i embriologija, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu).

Komisija za odbranu završene doktorske disertacije dr Sanje Milutinović-Smiljanić određena je na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 7.3.2013.godine. U sastavu komisije su:

1. Doc.dr Silvio De Luka, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet u Beogradu
2. Prof.dr Branislav Milovanović, Klinika za internu medicinu, KBC Bežanijska kosa
3. Prof.dr Vesna Danilović, Opšta i oralna histologija i embriologija, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije „Uloga centralnih V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u kardiovaskularnoj homeostazi“ je

## Zahvalnica

Veliku zahvalnost za izradu doktorske disertacije, kao i za svoj celokupan naučni rad, dugujem prvenstveno svom mentoru, prof.dr Nini Žigon. Zahvaljujući njoj sam zavolela nauku i opredelila se za rad u nauci.

Zahvalnost dugujem prof. Davidu Murphyu, sa Univerziteta u Bristolu, čiji su saveti, sugestije i velika pomoć unapredili moje bavljenje naukom.

Zahvaljujem se i svom komentoru, prof. dr Gordani Kuburović, zahvaljujući kojoj sam zavolela histologiju.

Zahvalnost dugujem i asist.dr Maji Lozić Đurić i asist.dr Sonji Stojičić na nesebičnoj pomoći prilikom izrade eksperimenata.

Zahvalna sam za veliku pomoć u savladavanju laboratorijskih tehnika, kao i svesrdnu pomoć tokom rada, laboratorijskom tehničaru, Verici Savić.

Zahvaljujem se i svim članovima laboratorije prof. dr Nine Žigon, dr Oliveri Šarenac, dr Tatjani Tasić, dr Mirjani Jovanović i dr Vasić Marku, na podršci.

Svoju doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici u znak zahvalnosti za veliko razumevanje, motivaciju i podršku u svemu što radim.

Sanja Milutinović-Smiljanić

## Sažetak rada

### Uloga centralnih V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u kardiovaskularnoj homeostazi

Poznato je da vazopresin modulira nervnu regulaciju kardiovaskularnog sistema centralno i periferno, ali tačan mehanizam još uvek je nepoznat. Da bi ispitali da li centralni V<sub>2</sub> receptori vazopresina modifikuju nervnu regulaciju kardiovaskularnog sistema ispitivali smo efekte centralno ubrizganog selektivnog antagoniste V<sub>2</sub> receptora na hemodinamske parametre: krvni pritisak, srčanu frekvenciju i njihov varijabilitet, pod bazalnim fiziološkim uslovima i u stresu. Pored toga, pod bazalnim fiziološkim uslovima ispitali smo efekat hiperekspresije V<sub>2</sub> receptora u paraventrikularnom jedru hipotalamusa na hemodinamske parametre neanestetisanog pacova. Krvni pritisak i srčana frekvencija registrovani su direktnom metodom preko katetera postavljenog u femoralnu arteriju ili radiotelemetrijskog transmitera u aortu. Nervna regulacija krvnog pritiska i srčane frekvencije evaluirana je spektralnom metodom. Pod bazalnim fiziološkim uslovima antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora nije modifikovao krvni pritisak i srčanu frekvenciju, ali je izazvao porast oscilacija veoma niskih frekvencija krvnog pritiska. Hiperekspresija V<sub>2</sub> receptora u paraventrikularnom jedru hipotalamusa pacova izazvala je porast niskofrekventnog varijabiliteta simpatičkog porekla kako u krvnom pritisku, tako i u srčanoj frekvenciji. Stres izazvan mlazom vazduha pod pritiskom usmeren u potiljak pacova prouzrokovao je istovremeni porast krvnog pritiska i srčane frekvencije, kao i njihovog niskofrekventnog varijabiliteta simpatičkog porekla i visokofrekventnog varijabiliteta respiratornog porekla. Pacovi pretretirani antagonistom V<sub>2</sub> receptora i potom izlagani stresu ispoljili su manji skok krvnog pritiska i varijabiliteta simpatičkog i respiratornog porekla, kao i kraći oporavak. Rezultati pokazuju da vazopresin putem stimulacije centralnih V<sub>2</sub> receptora utiče na kardiorespiratorni odgovor na stres.

**Ključne reči:** vazopresin, V<sub>2</sub>, stres, paraventrikularno jedro hipotalamusa, krvni pritisak, srčana frekvencija, varijabilitet

**Naučna oblast:** neuronauke

**Uža naučna oblast:** neurokardiologija

## Summary

### **The role of central vasopressin V2 receptors in cardiovascular homeostasis**

It is well established that vasopressin modulates neurogenic control of the circulation both centrally and peripherally. However the exact mechanism is still unexplored. To investigate whether central V2 receptors modulate the neurogenic control of the circulation, we studied the effects of centrally injected selective V2 antagonist on hemodynamic parameters: blood pressure (BP), heart rate (HR) and their variability, under baseline physiological conditions and during stress. We also investigated the effects of over-expression of V2 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus on cardiovascular hemodynamic under baseline conditions. BP and HR were assessed by direct recording via indwelling catheter in femoral artery or by radiotelemetric probe inserted in abdominal aorta. Neurogenic control of the circulation was assessed by spectral methodology. Under baseline physiological conditions V2 antagonist didn't modify the level of BP and HR and increased the very low frequency variability of BP. Over-expression of V2 receptors in the paraventricular nucleus increased sympathetically mediated, low-frequency oscillation of BP and HR. Exposure of rats to air-jet stress increased BP, HR and their sympathetically mediated low-frequency variability and respiration-induced high-frequency variability. Rats pre-treated with the V2 antagonist and exposed to stress exhibited lower BP increase and lower increase of BP variability, as well as shorter recovery time. It follows that vasopressin by the stimulation of central V2 receptors influence the cardiorespiratory response to stress.

**Key words:** vasopressin, V2, stress, hypothalamus, blood pressure, heart rate, cardiovascular variability

**Scientific field:** neuroscience, neurocardiology

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Otkriće neurohipofiznih hormona.....	1
1.2 Evolucija, struktura i distribucija neurohipofiznih hormona.....	1
1.3 Uloga vazopresina i oksitocina kao hormona.....	6
1.4 Uloga vazopresina i oksitocina kao neurotransmitera i neuromodulatora.....	7
1.5 Mehanizam dejstva neurohipofiznih peptida.....	8
2. HIPOTEZA.....	12
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	13
4. MATERIJAL I METODE.....	13
4.1 Eksperimentalne životinje.....	12
4.2 Hirurgija.....	14
4.3 Eksperimentalni dizajn.....	16
4.4 Registrovanje i obrada signala pulsog arterijskog krvnog pritiska.....	21
4.5 Statistička obrada podataka.....	23
4.6 Korišćene supstancije.....	23
5. REZULTATI.....	25
5.1 Efekti antagonista $V_2$ vazopresinskih receptora na kardiovaskularni sistem u bazalnim uslovima.....	25
5.2 Efekti antagoniste vazopresinskih $V_2$ receptora na kardiovaskularni sistem pod blokadom renin angiotenzinskog sistema.....	29
5.3 Efekti blokade vazopresinskih $V_2$ receptora na kardiovaskularni sistem pri izlaganju stresu imobilizacijom.....	35
5.4 Efekti blokade vazopresinskih $V_2$ receptora na kardiovaskularni sistem u stanju stresa mlazom vazduha pod pritiskom.....	44
5.5 Morfološka karakterizacija paraventrikularnog jedra.....	56
5.6 Morfološka verifikacija hiperekspresije vazopresinskih $V_2$ receptora nakon transfekcije adenovirusima.....	
5.7 Efekti transfekcije adenovirusnih vektora sa eGFP i vazopresinskim $V_2$ receptorima u odnosu na pacove sa transfeciranim eGFP, kao kontrolnom grupom, na kardiovaskularne parametre u bazalnim fiziološkim uslovima.....	83
6. DISKUSIJA.....	87
7. ZAKLJUČCI.....	92
8. LITERATURA.....	93

## I UVOD

### 1.1 Otkriće neurohipofiznih hormona

Fiziolog George Oliver i fizičar Edward Albert Schäfer 1895. god. uočili su da ekstrakt hipofize povećava krvni pritisak. Kendall Edward 1930. god. pokazao je da veliki neuroni hipotalamusa oslobađaju supstancu nađenu u hipofizi. Vincent du Vigneaud i Roger Acher 1955. god., nezavisno jedan od drugog, uspjeli su da izoluju vazopresin i oksitocin (1, 49, 50, 51). Vigneaud je iste te godine dobio Nobelovu nagradu za hemiju.

### 1.2 Evolucija, struktura i distribucija neurohipofiznih hormona

Evolucijski prethodnici vazopresina iz tzv. porodice oksitocina su prol-oksitocin i mezotocin zastupljeni kod torbara, placentalnih sisara i riba dvodihalica. Kod australijskih riba dvodihalica prisutan je [Phe<sup>2</sup>]mezotocin. Glumitocin se javlja kod raže, valitocin, aspragtocin, asvatocin, fazitocin i fasvatocin kod raznih vrsta ajkula, i izotocin kod zrakoperki. Prethodnici vazopresina iz „porodice vazotocina“ su [Lys<sup>8</sup>]vazopresin kod svinja i torbara, [Phe<sup>2</sup>]presin kod torbara i vazotocin (71, 79). Vazotocin, nanopeptid najsljedniji vazopresinu i oksitocinu, sintetise se u hipotalamusu primitivnih kičmenjaka, od ciklostoma do ptica (133, 209), a kod nekih primitivnih sisara sintetise ga i epifiza (133). Pokazano je da vazotocin regulise volumen i osmolarnost ekstracelularne tečnosti vodozemaca, gmizavaca i ptica (2, 133, 209). Belmont je sa saradnicima pokazao da akutan stres izaziva povećanu koncentraciju mRNA vazotocina u hipotalamusu, kao i porast kortizola u plazmi ribe iverka, što ukazuje na ulogu vazotocina u odgovoru na stres (14). Vazotocin utiče na metabolizam indirektno preko hipotalamo-hipofizne osovine izazivajući sekreciju kortizola koji ubrzava metabolizam, i direktno stimulacijom glikogenolize u hepatocitima ribe (3). Izaziva porast arterijskog krvnog pritiska kod riba tako što smanjuje regionalni protok i distribuciju krvi u škrgama i krvnim sudovima ribe izazivajući vazokonstrikciju (14, 132, 208). Vazotocin omogućava reprodukciju izazivajući ekspulziju jaja kod ptica (178), sekreciju feromona, i otvaranje spermatofora kod vodozemaca (202).

Iz vazotocina substitucijom izoleucina fenilalaninom na trećoj poziciji kod sisara nastaje drugi nonapeptid, vazopresin (14, 115, 207), dok oksitocin nastaje zamenom arginina

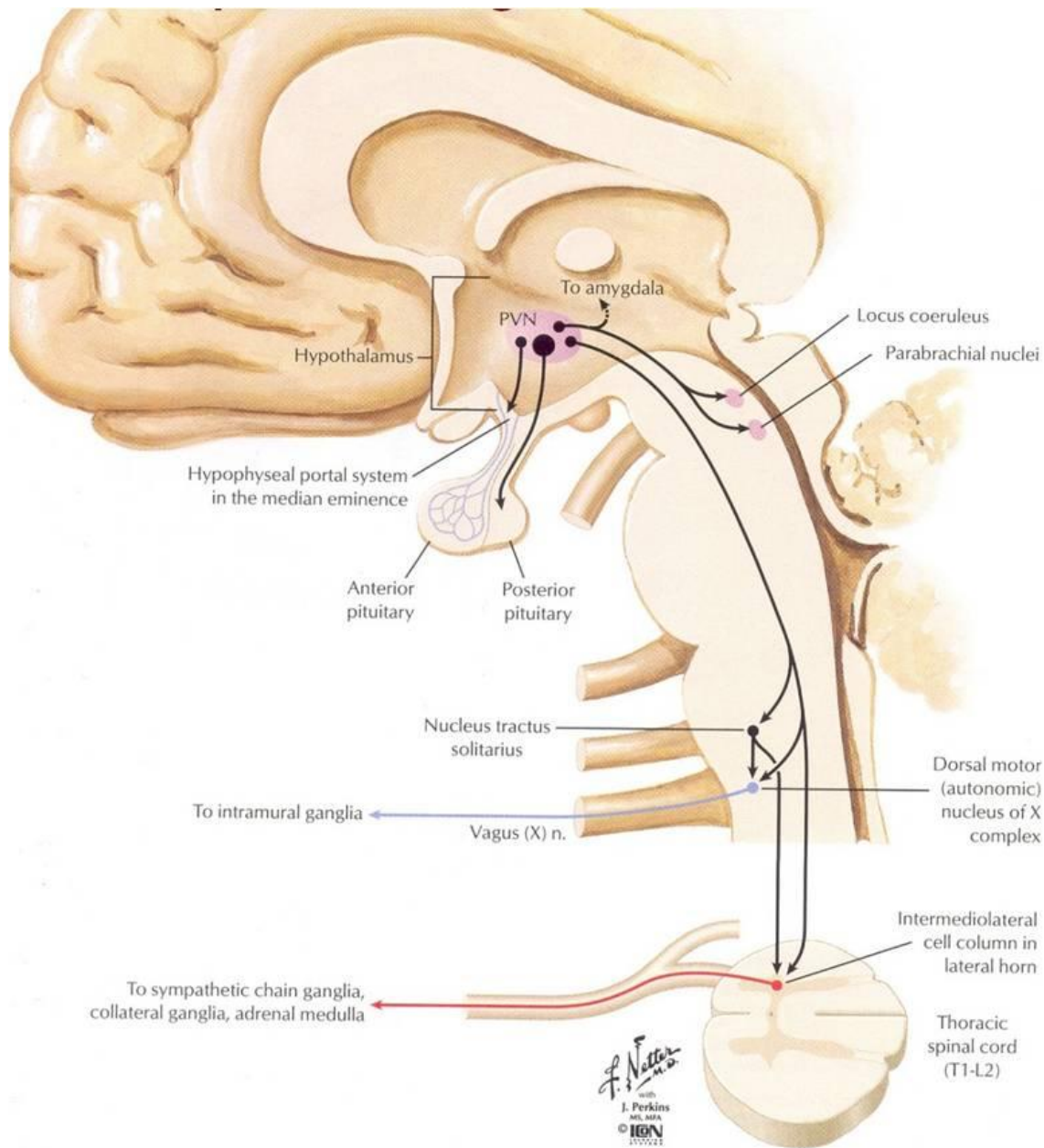




Magnocelularni neuroni PVN-a primaju ekscitatornu adrenergičku inervaciju iz A1 grupe neurona kaudalne ventrolateralne medule, A2 grupe neurona nucleus tractusa solitariusa (NTS), kao i iz olfaktornog bulbusa. Većina ovih aferentnih vlakana sadrži neuropeptide kao konvencionalne transmitere (somatostatin, angiotenzin, endogeni opiodi). Oksitocinske ćelije su najosetljivije na alfa-melanocito-stimulirajući hormon i oksitocin, dok su vazopresinske ćelije najosetljivije na vazopresin. Oksitocinske i vazopresinske ćelije primaju dopaminergička, holinergička i histaminergička aferentna vlakna. Magnocelularni neuroni su osmosenzitivni, ali promena osmolariteta nije dovoljna da izazove sekreciju vazopresina i oksitocina. Ovi neuroni primaju signale iz nekoliko regiona mozga o hidrataciji životinje. Najvažniji region je ventralni i anteriorni zid treće komore. Ovaj region sadrži receptore u nucleus medianusu i u dva cirkumventrikularna organa – organum vasculosum laminae terminalis i subfornikalnom organu. Neuroni ovih organa projektuju aksone do magnocelularnih neurona supraoptičkog i paraventrikularnog jedra hipotalamusa i prenose informacije o osmolarnosti plazme i cirkulišućim faktorima, kao što su peptidi angiotenzin i relaxin (135). Na sekreciju vazopresina utiču i promene krvnog pritiska koje registruju arterijski baroreceptori u aorti i karotidnim arterijama (86), promene volumena krvi registrovane receptorima na ušću velikih vena u levu pretkomoru (40) i koncentracije kiseonika detektovanih hemoreceptorima (121). Parasimpatičkim IX i X kranijalnim nervima ove informacije iz perifernih receptora stižu u NTS i hipotalamus gde regulišu sintezu i oslobađanje vazopresina.

Svaki magnocelularni neuron ima pojedinačni dugi varikozni akson koji se projektuje u pars posterior neurohipofize sa nekoliko kolateralnih grančica. Pojedinačni akson sadrži više od 2000 neurosekretornih završetaka i oko 400 aksonskih ispupčenja sa velikim brojem vezikula koje sadrže hormone. Svaki nervni završetak sadrži oko 250 vezikula. Jedna vezikula ima 85000 molekula oksitocina ili vazopresina. Oni se egzocitozom izlučuju u krvotok kao odgovor na ulazak kalcijuma kroz jonske kanale usled pojave akcionog potencijala duž aksona. Aksoni magnocelularnih neurona nemaju povratne kolaterale. Međusobno komuniciraju oslobađanjem neuroaktivnih supstanci, uključujući vazopresin i oksitocin, iz samih dendrita. Dendritske ćelije su u morfološkoj asocijaciji sa glija ćelijama, specijalizovanim astrocitima, koji okružuju skupine dendrita, pojačavajući dendro-dendritsku komunikaciju između ćelija. Asocijacija dendritskih i glija ćelija uključuje određen stepen hemijske komunikacije. Magnocelularni neuroni obično

imaju dva ili tri duga dendrita. Jedan dendrit vazopresinergičkog neurona sadrži oko 11000 vezikula. Magnocelularni neuroni stvaraju oko 10000 sinapsi sa eferentnim neuronima i prenose informacije neurotransmiterima kao što su glutamat ili GABA, i to najčešće iz delova mozga koji su u blizini zida treće komore – subfornikalnog organa, organuma vasculosuma i lamine terminalis nucleus medianusa (135). Iz PVN-a i SON-a vazopresin i oksitocin se sa prekursorskim supstancama, zvanim neurofizini, prenose do nervnih završetaka u neurohipofizi gde se vazopresin i oksitocin skladište. Neurosekretorni putevi vazopresina se jednim delom pružaju direktno u cirkulaciju odakle ih apsorbuju obližnji kapilari i raznose putem krvi do ciljnih organa. Aksoni se iz magnocelularnih neurona PVN-a pružaju do pars posterior neurohipofize, a iz parvocelularnih neurona do eminencije mediane neurohipofize i primarnog kapilarnog pleksusa, odakle kortikotropin rilizing hormon (CRH), vazopresin i oksitocin prelaze u portnu cirkulaciju. CRH i vazopresin zajedno regulišu lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz adenohipofize vezujući se za vazopresinske receptore (56, 88). Iz magnocelularnih neurona PVN-a neurosekretorni putevi se pružaju do amigdale gde vazopresin utiče na emocionalno i socijalno ponašanje (219). Aksonske projekcije magnocelularnih neurona stižu i do locus coeruleusa i dorzalnog parabrahijalnog jedra gde vazopresin učestvuje u kardiovaskularnoj regulaciji (75, 148, 180). Aksonske projekcije pružaju se i u periakveduktalnu sivu masu (PAG) (140), i u kičmenu moždinu, i to u rostroventrolateralnu medulu (RVLM) (140, 170), NTS (13, 180) i u intermediolateralnu kolumnu roga kičmene moždine (IML) (100,140, 172, 192). RVLM, NTS i IML su odgovorni za integraciju perifernog simpatičkog i vagalnog uticaja (52). Neurosekretorni putevi se iz PVN-a pružaju i u dorzalni vagalni kompleks gde su receptori visokog afiniteta za vazopresin i oksitocin (30, 56, 218). Vazopresinski i oksitocinski neuroni iz parvocelularnog dela PVN-a projektuju se u pre-Bocingerov kompleks i frenične motoneurone gde vazopresin ostvaruje kardiovaskularne i respiratorne efektet (121). Oslobođen vazopresin u sinaptičkoj pukotini se ne reciklira, niti razgrađuje, već se širi i vezuje za raspoložive receptore. Ispoljava autokrino i parakrino dejstvo (139). Vazopresin se iz PVN-a difunduje i u cerebrospinalnu tečnost, pa putem cerebrospinalne tečnosti, volumenskom transmisijom, do udaljenih mesta centralnog nervnog sistema gde izaziva dugotrajne efekte (20, 30) (slika 2) .



**Slika 2. Vazopresinergički putevi na sagitalnom preseku mozga (58)**

Na slici 2 prikazani su neurosekretorni vazopresinergički putevi iz paraventrikularnog jedra (PVN) do adenohipofize i neurohipofize, moždanog stabla, produžene i kičmene moždine.

Zajedno sa vazopresinom i oksitocinom istovremeno se u neurohipofizi sintetišu i oslobađaju i drugi neuropeptidi kao što su holecistokinin (najviše ga ima u oksitocinskim

neuronima), galanin (preovlađuje u vazopresinskim neuronima), opioidni peptid dinorfin (rasprostranjeniji je kod vazopresinskih nego kod oksitocinskih neurona), apelin, neuropeptid Y, azot monoksid sintaza, endokanabinoid itd. Njihova uloga u fiziološkim i patofiziološkim procesima još uvek nije u potpunosti razjašnjena (32, 130).

Vazopresin i oksitocin deluju kao hormoni, a i kao neurotransmiteri i neuromodulatori.

### **1.3 Uloga vazopresina i oksitocina kao hormona**

Cirkulacijom vazopresin dospeva do ciljnih organa među kojima su bubrezi i krvni sudovi gde reguliše volumen ekstracelularne tečnosti, krvni pritisak, periferni otpor i baroreceptorski refleks (166).

Najvažnije fiziološke uloge vazopresina su regulacija volumena ekstracelularne tečnosti i održavanje krvnog pritiska. U plazmi se nalazi u uskom opsegu od 284 do 295 mosmol/kg (59). Malo povećanje osmolariteta plazme (2 %) dovodi do oslobađanja vazopresina i retencije vode u bubrezima sa ciljem korigovanja promene osmolarnosti plazme (18, 164). Vazopresin deluje na glavne ćelije bubrežnih sabirnih kanalića preko  $V_2$  receptora tako što izaziva translokaciju akvaporin 2 vodenih kanalića iz vezikula u citoplazmi na površinu membrane glavnih ćelija sabirnih kanalića. Neophodno je prisustvo i akvaporin 3 i 4 vodenih kanalića smeštenih na bazoletaralnoj membrani glavnih ćelija sabirnih kanalića. Akvaporinski kanalići omogućavaju molekulima vode da prođu apikalnu membranu kao odgovor na promenjen osmotski gradijent tj. nastaje povećanje njihove permeabilnosti za molekule vode što vodi i ka smanjenom formiranju urina. Vazopresin se brzo metaboliše vazopresinazama u jetri i bubrezima i njegov polu-život je 10 – 35 minuta (4, 151).

Periferna uloga vazopresina je i vazokonstrikcija. Vazopresin je najjači vazokonstriktor molarog opsega u našem organizmu (9). Vezuje se za  $V_1$  receptore na glatkim mišićima krvnih sudova i izaziva vazokonstrikciju inozitol-3-fosfat ( $IP_3$ ) signalnim putevima što povećava intracelularnu koncentraciju kalcijuma i izaziva porast perifernog otpora u nekim vaskularnim koritima. Kod normotenzivnih jedinki vazopresin u fiziološkim koncentracijama ne izaziva porast krvnog pritiska (KP) jer istovremeno povećava osetljivost barorefleksa. Vazopresin može da izazove vazodilataciju što ukazuje na kompleksnost perifernih efekata vazopresina. U krvnim

sudovima pluća i skeletnih mišića vazopresin se vezuje za vazopresinske receptore, nalik  $V_2$  receptorima, i izaziva vazodilataciju. Vazodilatacioni efekat vazopresina preko ovih receptora povezan je sa povećanjem sinteze i oslobađanja azot monoksida i prostanglandina (135, 177).

Vazopresin povećava, ili vraća na početnu vrednost (»resetuje«) senzitivnost baroreceptora vezujući se za receptore u arei postremi zečeva gde inhibiše simpatički sistem i pomera krivu barorefleksa na niže vrednosti arterijskog pritiska (42, 85, 86).

Vazopresin ima i druge fiziološke funkcije. Izaziva agregaciju trombocita (87), sekreciju faktora koagulacije VIII i Von Willebrandovog faktora (118, 145), stimuliše glikogenolizu u jetri (101), izaziva sekreciju angiotenzina II iz nadbubrega (157) i stimuliše kontrakcije miometrijuma uterusa (21, 48).

Ciljni organi oksitocina su materica i dojke. Oksitocin ima važnu ulogu u reprodukciji jer stimuliše laktaciju i potencira kontrakcije miometrijuma materice (33, 133).

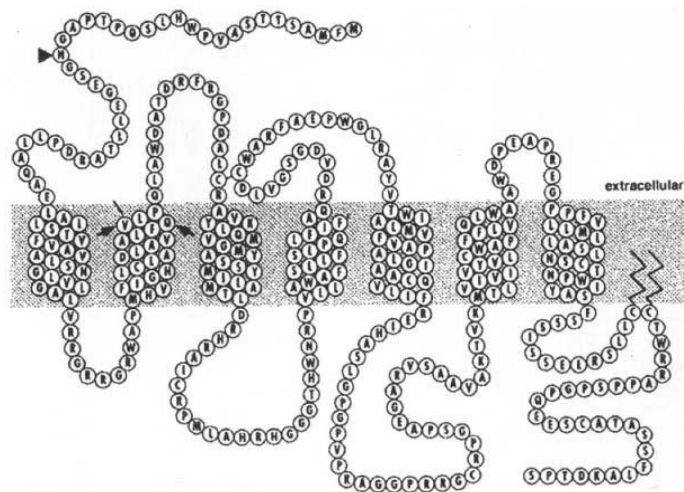
#### **1.4 Uloga vazopresina i oksitocina kao neurotransmitera i neuromodulatora**

Klasičnom neurotransmisijom, ili kao neuropeptid, vazopresin ima ulogu u neuroendokrinoj regulaciji. Reguliše sekreciju kortizola i ACTH, kao i oslobađanje noradrenalina, pa je vazopresin naročito bitan u stanju stresa. Kod hipovolemijskog šoka (fizički stres) vazopresin smanjuje srčanu frekvencu produžavajući život (47, 98, 188, 190, 217). Emocionalni stres (psihički stres) aktivira parvocelularni deo PVN-a koji oslobađa kortikotropni rilizing hormon (CRH) u portnu cirkulaciju i izaziva porast ACTH u sistemskoj cirkulaciji (56). Vazopresin utiče i na emocije i ponašanje. Stimuliše vezivanje za druge osobe (*pairbonding*), društvene interakcije i socijalnu diskriminaciju (62, 63, 130). Vazopresin potencira agresivno ponašanje i impulsivnost (34). Stimuliše pamćenje, socijalnu (prepoznavanje lica ljudi) i prostornu orijentaciju (34, 53, 130). Vazopresin reguliše autonomne funkcije, i to tako što moduliše kardiovaskularne parametre (22, 59, 130), snižava telesnu temperaturu (46, 116, 167) i ekscitatorno deluje na respiraciju (89). Pokazano je da vazopresin u PVN-u smanjuje prag bola (214), dok u periakveduktalnoj sivoj masi (PAG) povećava prag bola tako što povećava koncentraciju leucin-enkefalina, leucin-metionina i  $\beta$ -endorfina (215).

Oksitocin sintetisan u parvocelularnim neuronima PVN-a aksonima stiže u moždano stablo i kičmenu moždinu gde stimuliše ljubav, poverenje, emotivno i socijalno vezivanje (*pairbonding*) (62, 63, 87), socijalnu memoriju (34), učenje i pamćenje (34). Oksitocin smanjuje agresiju kod ljudi izazivajući saosećanje (183) i bliskost (126). Smanjuje potrebu za unosom hrane (10, 11, 156) pa doprinosi održavanju normalne telesne težine. Oksitocin povećava prag za bol (27, 173). U stresu oksitocin deluje anksiolitički i smanjuje oslobađanje ACTH (134). Kod žena oksitocin izaziva kontrakcije materice tokom porođaja i stimuliše materinska osećanja (48, 57, 136), a kod muškaraca potencira erekciju i orgazam (82, 133, 135). Oksitocin potencira depresiju kod oba pola (43, 146, 169). Novije studije pokazuju da neadekvatna sinteza oksitocina doprinosi poremećajima socijalnog ponašanja (*autism spectrum disorders*) kao što su autizam, retardacija, napadi panike i razni psihološki problemi (53, 96, 97, 133). Oksitocin učestvuje u etiopatogenezi shizofrenije (196). Zbog svog antipsihotičkog dejstva oksitocin se ispituje kao potencijalna terapija shizofrenije i autizma (142, 174).

## **1.5 Mehanizam dejstva neurohipofiznih peptida**

Vazopresin i oksitocin ostvaruju svoje dejstvo vezujući se za vazopresinske i oksitocinske receptore. Do sada su farmakološki identifikovana tri tipa vazopresinskih receptora  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  i  $V_2$ . Za vazopresinske i oksitocinski receptor određena je primarna, sekundarna i tercijarna struktura tj. redosled aminokiselina. Vazopresinski i oksitocinski receptori su glikoproteini sastavljeni iz sedam hidrofobnih transmembranskih  $\alpha$ -heliksa kod kojih je amino ( $-\text{NH}_2$ ) kraj postavljen ekstracelularno, a karboksilni ( $-\text{COOH}$ ) kraj intracelularno. Svoje dejstvo ostvaruju vezujući se za G proteine (15, 33, 77, 187, 201). Zajednički su im mesto glikolizacije na asparaginskoj rezidui prisutnoj na ekstracelularnom domenu i disulfidni most između dve cisteinske rezidue na drugom i trećem ekstracelularnom domenu (15) (slika 1).



**Slika 3. Struktura vazopresinskog receptora (114)**

### **Vazopresinski V<sub>1a</sub> receptor (struktura, funkcija)**

Vazopresinski V<sub>1a</sub> receptor je glikoprotein sastavljen od 418 aminokiselina. Glikolizovan je na tri mesta. Veživanjem vazopresina za V<sub>1a</sub> receptore pokreću se različiti signalni putevi u ćeliji. Preko G<sub>q/11</sub> proteina dolazi do aktivacije fosfolipaze C (PLC) i povećanja koncentracije intracelularnog inozitol-(3)-fosfata (IP<sub>3</sub>) i diacil-glicerola (DAG) što dalje povećava koncentraciju intracelularnog Ca<sup>2+</sup> jona i aktivira protein kinazu. Ovako nastaju brzi efekti kao što su vazokonstrikcija, oslobađanje ACTH i agregacija trombocita, kao i povećanje transkripcionog faktora AP-1 koji deluje mitogeno (90, 161). Sporiji efekti, kao što su socijalna memorija (66), uterotonično delovanje (21, 48, 165), proteoliza, glikogenoliza i lipolitički efekat (93), nastaju preko manjih G proteina. Kod sporijih efekata se pored PLC aktivira i fosfolipaza A<sub>2</sub> i fosfolipaza D (28).

Gen za vazopresinski V<sub>1a</sub> receptor nalazi se na 12. hromozomu u regionu 12q14-15 (200).

Centralno su vazopresinski V<sub>1a</sub> receptori lokalizovani u korteksu, SON-u i PVN-u, periakveduktalnoj sivoj masi (PAG), limbičkom sistemu, donjim delovima moždanog stabla – NTS-u i u RVLM, kao i u IML kičmene moždine, gde vazopresin modifikuje vazomotorni tonus i rad srca (91, 92, 157, 158).

Periferno, vazopresinski V<sub>1a</sub> receptori lokalizovani su na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova i vežući se za njih vazopresin izaziva vazokonstrikciju i povećanje perifernog otpora. U masnim ćelijama vazopresin preko V<sub>1a</sub> receptora ostvaruje lipolitički efekat (93). Vazopresin se

vezuje za  $V_{1a}$  receptore u jetri i stimuliše glikogenolizu (101, 198). Preko  $V_{1a}$  receptora u uterusu vazopresin stimuliše kontrakcije miometrijuma (21, 48, 165). Preko  $V_{1a}$  receptora u intersticijalnim ćelijama srži i maculi densi bubrega vazopresin stimuliše sintezu renina i učestvuje u održavanju volumena ekstracelularne tečnosti (4, 31, 127, 164). Vazopresin preko  $V_{1a}$  receptora lokalizovanih u meduli nadbubrežne žlezde stimuliše proliferaciju i regeneraciju ćelija zone glomerulose i dela zone fasciculata (161, 203), i stimuliše sekreciju aldosterona i kortizola (23, 186). Vezujući se za  $V_{1a}$  receptore na trombocitima vazopresin stimuliše njihovu agregaciju (61).

Vazopresinski  $V_{1a}$  receptori su u povećanom broju eksprimirani ili prisutni u mutiranom obliku u nadbubregu pacijenata obolelih od Kušingovog sindroma izazvanih hiperplazijom nadbubrega i u ACTH-nezavisnim tumorima (72, 81, 99, 129, 162).

### **Vazopresinski $V_{1b}$ receptor (struktura, funkcija)**

$V_{1b}$  receptori su glikoproteini koji sadrže 424 amino kiseline (193). Stimulacijom ovih receptora vazopresina aktivira se Gq-PLC-IP3- $Ca^{2+}$  signalni put i povećava oslobađanje ACTH (5, 35, 74, 200).

Gen za vazopresinski  $V_{1b}$  receptor nalazi se na prvom hromozomu na lokaciji 1q32 (176).

$V_{1b}$  receptori lokalizovani su centralno u adenohipofizi, korteksu, SON-u i PVN-u, PAG-u, limbičkom sistemu, bed nucleusu, strii terminalis, septumu, amigdali i hipokampusu, kao i u donjim delovima moždanog stabla (91, 92, 191).

Periferno,  $V_{1b}$  receptori lokalizovani su u mnogim organima. U pankreasu vazopresin preko  $V_{1b}$  receptora stimuliše sintezu i oslobađanje glukagona iz alfa ćelija Langerhansovih ostrvaca (65, 216). Vezujući se za  $V_{1b}$  receptore u hromafinim ćelijama medule nadbubrežnih žlezda vazopresin stimuliše sekreciju kateholamina i potencira sekreciju ACTH (72, 73), pa na taj način učestvuje u odgovoru na emocionalni stres. Vazopresinski  $V_{1b}$  receptori prisutni su i u crevima i preko njih vazopresin ostvaruje proinflamatorni efekat, zbog čega se  $V_{1b}$  antagonisti ispituju kao potencijalna terapija kolitisa (60). Različiti tumori kao što su karcinomi pluća i kortikotropin-sekretujući tumori takođe sadrže vazopresinske  $V_{1b}$  receptore (45, 72, 154)



## Vazopresinski V<sub>2</sub> receptor (struktura, funkcija)

Vazopresinski V<sub>2</sub> receptor je po strukturi glikoprotein sastavljen iz 370 aminokiselina. Po strukturi se razlikuje od V<sub>1a</sub> receptora po broju mesta glikolizacije. Vazopresinski V<sub>2</sub> receptor ima samo jedno mesto glikolizacije na ekstracelularnom NH<sub>2</sub> kraju (105). Vezivanjem za G protein aktivira se adenilatna ciklaza, produkuje cAMP i aktivira protein kinaza A.

Gen za vazopresinski V<sub>2</sub> receptor nalazi se na dugom (q) kraku X hromozoma, na poziciji 28 (137).

Periferno, V<sub>2</sub> receptori lokalizovani su na bazolateralnoj membrani ćelija sabirnih kanalića bubrega, u jetri i u plućima. Najvažniji efekat V<sub>2</sub> receptora je antidiuretski. Syarmiento je sa sar. pokazao da vazopresinski V<sub>2</sub> receptor u bubregu ima dve subjedinice, *a* i *b*, pri čemu *b* subjedinica reguliše površinsku ekspresiju *a* subjedinice receptora formiranjem *a+b* heterodimera koji se uvlači u unutrašnjost ćelije i reciklira (70, 104, 197). Vazopresin preko V<sub>2</sub> receptora reguliše ekspresiju akvaporina u ćelijama sabirnih kanalića bubrega i tako utiče na povećanu reapsorpciju vode iz primarnog urina (24, 123). Preko V<sub>2</sub> receptora u endotelnim i sinusoidnim ćelijama jetre, kao i u endotelijalnim ćelijama pluća, vazopresin stimuliše oslobađanje von Willebrand-ovog faktora, faktora koagulacije VIII i aktivatora tkivnog plazminogena (118, 119).

Nema puno podataka o centralnoj lokalizaciji V<sub>2</sub> receptora. Primećeno je da su V<sub>2</sub> receptori prisutni u malom i velikom mozgu pacova tokom embrionalnog razvoja (92, 157). To je potvrđeno novijim istraživanjima, *in situ* hibridizacijom, imunocitohemijom, autoradiografijom i metodom *real time* PCR. Pokazana je celularna distribucija obe subjedinice vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora, *a* i *b*, u Purkinjeovim ćelijama cerebelluma, u spoljašnjem granularnom sloju i tranzitorno u Bergmanovim vlaknima, od ranog do kasnog postnatalnog razvoja (206). Kato je *in situ* hibridizacijom i metodom *real time* PCR uočio prisustvo mRNA i u malom mozgu odraslih pacova (117). Prisustvo mRNA V<sub>2</sub> receptora u malom mozgu odraslih pacova genetskim i imuhistohemijskim metodama pokazala je i Foletta sa sar. (64). Rezultati dobijeni sa peptidnim i nepeptidnim selektivnim antagonistima vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora ukazuju na moguće prisustvo ovih receptora u arei postremi (AP), u kaudalnom delu medule (179, 204) i u PVN-u. Mikroinjekcijama vazopresina, V<sub>1a</sub> i V<sub>2</sub> antagonista u PVN pacova, pokazano je da vazopresin preko V<sub>2</sub> receptora u PVN-u pacova smanjuje prag bola (214), dok ga u PAG-u povećava (215).

### **Oksitocinski receptor (struktura, funkcija)**

Oksitocinski receptor je polipeptid od 389 aminokiselina. Vezivanjem za  $G_{\alpha q11}$  protein oksitocin aktivira fosfolipazne signalne puteve (68, 124, 128, 106). Oksitocinski receptor se nalazi na hromozomu 3p25 (189).

Receptori oksitocina difuzno su raspoređeni u centralnom nervnom sistemu. U većem broju zastupljeni su u bazalnom delu Mejnertovog jedra, regiji Broka, ventralnom delu lateralnog septalnog jedra, preoptičkom delu hipotalamusa, posteriornom hipotalamusu, substantii nigri pars compacta u substantii gelatinosa kaudalnog trigeminalnog jedra u dorzalnom rogu kičmene moždine, kao i u medio-dorzalnom delu NTS-a (133).

Periferno, oksitocinski receptori pronađeni su u mioepitelnim ćelijama dojke, i endometriju. Oksitocin stimuliše kontrakcije uterusa tokom porođaja i ejakciju mleka tokom laktacije (133, 146). Receptori oksitocina lokalizovani su maculi densi, u bubrežima, i preko njih oksitocin stimuliše natriurezu (39). Pokazano je da oksitocin vezujući se za receptore u srcu stimuliše sintezu atrijalnog natriuretičkog peptida što usporava rad srca, smanjuje jačinu kontrakcija i izaziva smanjenje volumena cirkulišuće krvi (78). Jankovski je sa sar. pokazao da se oksitocin sintetiše periferno u krvnim sudovima odakle reguliše tonus krvnih sudova i stimuliše njihovu regeneraciju (107).

## **2.HIPOTEZA**

Pretpostavili smo da bi u centralnom nervnom sistemu odrasle jedinke pacova mogli da postoje vazopresinski  $V_2$  receptori koji učestvuju u kardiovaskularnoj homeostazi. U ovom radu fokusirali smo se na paraventrikularno jedro hipotalamusa koje ima ključnu ulogu u integraciji neuroendokrinog odgovora na stres.

### **3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitivanje efekata intracerebroventrikularno ubrizganog antagoniste vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na kardiovaskularne parametre neanestetisanih pacova pod bazalnim fiziološkim uslovima i u toku izlaganja emocionalnom stresu
2. Ispitivanje efekata hiperekspresije vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u paraventrikularnom jedru hipotalamusa pacova na funkcionisanje kardiovaskularnog sistema pod bazalnim fiziološkim uslovima

### **4. MATERIJAL I METODE**

Sve eksperimentalne procedure u radu izvedene su u skladu sa preporukama o etičkom radu sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta u Beogradu (Pravilnik za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu iz 2004.god.) i odobrene su od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta. Broj Rešenja za rad sa eksperimentalnim životinjama je 818/2/2-2.

#### **4.1 Eksperimentalne životinje**

Eksperimenti su izvedeni na neanestetisanim normotenzivnim pacovima, mužjacima Wistar nesrodničkog (outbred) soja, telesne težine 300-350g. Pacovi su nakon hirurških intervencija smeštani u pojedinačne kaveze (25 x 25 x 25cm), i čuvani pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima (temperatura:  $23 \pm 1$  °C; relativna vlažnost: 60-70 %; ciklus svetlo/tama 12/12 h) sa hranom (0,2% NaCl, Veterinarski zavod, Subotica) i vodom *ad libitum*. Broj životinja „n“ u svakoj eksperimentalnoj grupi određivan je na osnovu srednje razlike promene parametara ( $\delta$ ) i standardne devijacije ( $\sigma$ ) u prva četiri eksperimenta za tip I grešku verovatnoće  $\alpha - 0,05$  i snagu  $\pi - 95\%$  u programu "Power and Sample Size Calculations" koji se može besplatno „skinuti“ sa interneta (<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>). U svim eksperimentima pacov je bio sam sebi kontrola. Pre davanja supstancija pacovima je ubrizgana ista zapremina rastvarača (izotoničnog rastvora NaCl) da bi se isključio uticaj zapremine tečnosti

na promene kardiovaskularnih parametara koje registrujemo. Po završetku eksperimenata pacovi su žrtvovani letalnom dozom natrijum tiopental (200 mg/kg, i.p.).

## **4.2 Hirurgija**

Grupi pacova (n = 66) implantirana je, korišćenjem stereotakse, intracerebroventrikularna (i.c.v.) kanila za i.c.v. davanje supstancija. Nakon oporavka od šest dana pacovima je implantiran i arterijski kateter za merenje pulsnoг talasa.

### **Stereotaksična hirurgija**

Sve intervencije izvedene su u kombinovanoj ketamin ksilazinskoj anesteziji (0,3ml 10% ketamina i.p. i 0,1ml 2% ksilazina i.p.). Pacovu je, korišćenjem stereotakse, implantirana kanila (G22) u lateralnu komoru 4 mm ispod parijetalne kosti prema koordinatama iz atlasa (160), anteroposteriorno AP = -1,08mm od bregme i lateralno LAT = 1,5mm od srednje linije. Kanila je fiksirana glas jonomer cementom (GC Fuji II LC- Improved). Potom je koža zašivena poprečnim šavovima.

Nakon završetka eksperimenata morfološki je verifikovan položaj kanile. To je učinjeno makroskopski tako što je anestetisanim pacovima kroz i.c.v. kanilu ubrizgano 5 µl boje metilen plavo. Samo su pacovi sa plavom prebojenošću ventrikula moždane komore uključeni u analizu. Položaj kanile verifikovan je i mikroskopski tako što su pacovi dekapitovani, njihovi mozgovi izolovani, smrznuti tečnim azotom i zaleđeni na -80 °C. Na kriotomu (Jung CM 1800) isečeni su reznjevi na kojima je urađeno hematoksilin eozinsko bojenje.

### **Implantacija arterijskog katetera**

Implantacija arterijskog katetera izvedena je pet dana nakon implantacije intracerebroventrikularne kanile. Intervencija je izvedena pod halotanskom anestezijom jer je kratkotrajna i omogućava brz oporavak životinje. Korišćena je Univentor 400 jedinica za anesteziju malih životinja (TSE Systems, Nemačka) sa početnom koncentracijom od 4% koja je potom smanjena na 2,1%. Za registrovanje pulsnoг pritiska implantiran je polietilenski (PE)

kateter, prethodno ispunjen fiziološkim rastvorom, u desnu femoralnu arteriju. Potom je koža zašivena poprečnim šavovima. Svi pacovi su postoperativno sistemski tretirani penicilinom (Jugocilin<sup>®</sup> liobočice, Galenika a.d. Beograd, 30 000IJ i.m.) i rana lokalno kombinovanim sprejom bacitracina i neomicina (Enbecin aerosip, Galenika a.d. Beograd), rasprskavanjem po šavovima. Neposredno nakon budjenja svaki pacov je primio 200mg/kg metamizola s.c. (Novalgetol<sup>®</sup> ampule, Galenika a.d. Beograd) radi smanjenja postoperativnog bola.

### **Implantacija radiotelemetrijskog transmitera u aortu pacova**

Zasebnoj grupi pacova (n = 12) implantirani su radiotelemetrijski transmiteri za registraciju krvnog pritiska i srčane frekvence. Nakon oporavka od 7 – 10 dana transfecirani su im adenovirusni vektori koji poseduju gene za ekspresiju vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora i eGFP-a. Osmog dana po transfekciji pacovi su podvrgnuti stres protokolu. Radiotelemetrijski transmiteri TA-11-PA C40 Data Scientific International (Transoma Medical, USA) implantirani su u abdominalnu aortu pod kombinovanom ketamin ksilazinskom anestezijom (0,3ml 10% ketamina i.p. i 0,1ml 2%ksilazina i.p.). Nakon pravljenja abdominalnog reza dužine 3cm i retrakcije creva, omogućen je pristup abdominalnoj aorti. Pomoću vođice (igla 21G) vrh katetera radiotelemetrijskog transmitera uveden je u abdominalnu aortu i fiksiran tkivnim lepkom (3M Vetbond<sup>TM</sup>) i tkivnim papirom od celuloze (DSI<sup>TM</sup>). Telo transmitera pričiveno je za prednji abdominalni zid. Potom je rez zatvoren hirurškim šavovima. Pre hirurške intervencije pacovi su tri dana tretirani gentamicinom 25mg/kg i.m., kao i na dan hirurške intervencije. Pre uvođenja u eksperimentalni protokol pacovi su se oporavljali osam dana.

### **Transfekcija modifikovanim adenovirusima**

Pacovima sa ugrađenim radiotelemetrijskim uređajima pod kombinovanom ketamin ksilazinskom anestezijom (0,3 ml 10% ketamina i.p. i 0,1 ml 2% ksilazina i.p.) u stereotaksičnom ramu staklenim mikropipetama ubrizgani su u PVN, po koordinatama iz atlasa (1,8mm kaudalno od bregme duž središnje linije, 0,3mm lateralno od bregme, 7,6 – 7,8 mm u dubinu od površine lobanje) (160) adenovirusni vektori Ad.CMV.eGFP (titar  $1,57 \times 10^{10}$  pfu/ml) i

Ad.CMV.V2 (titar  $2,5 \times 10^{10}$  pfu/ml) u odnosu 1:1 (50 nl) ili je, kao kontrola, ubrizgano samo 50nl Ad.CMV.eGFP (171). Ad.CMV.eGFP je rekombinantni humani adenovirus tipa 5 koji eksprimira pojačano zelen fluorescentni protein (*enhanced green fluorescent protein*; eGFP) pod kontrolom CMV (citomegalovirus) promotora. Zeleni fluorescentni protein (GFP) je protein originalno izolovan iz meduze koja fluorescira zeleno kada je izložena plavom svetlu. Pojačan GFP (eGFP) je GFP mutant sa pojačanom fluorescencijom i stabilnošću. Rekombinantni eGFP adenovirus služi kao kontrola za druge rekombinantne viruse u našem slučaju za adenoviruse sa genima za  $V_2$  receptore, jer se lako vide na fluorescentnom mikroskopu, lako determinišu efikasnost transdukcije i optimiziraju uslove virusne infekcije. Adenovirusni vektori napravljeni su u saradnji sa laboratorijom prof. Davida Murphya na Univerzitetu u Bristolu. Osmog dana nakon genskog transfera, kada je došlo do pune ekspresije transfeciranih gena, pacovi su podvrgnuti eksperimentalnom protokolu.

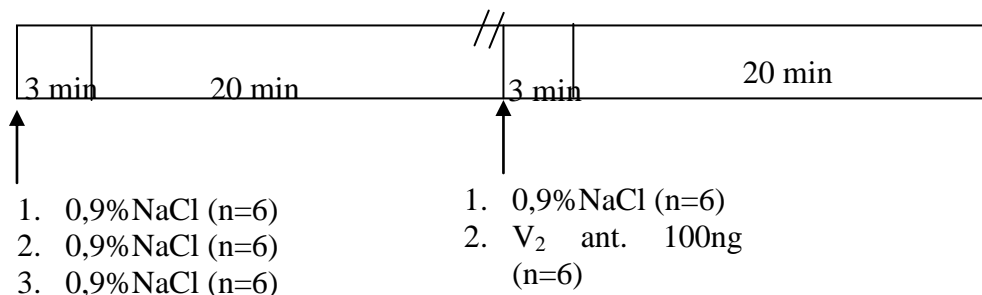
Na kraju eksperimenta urađena je morfološka verifikacija ekspresije vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru. Pacovi su nakon eksperimenta, pod ketamin ksilazinskom anestezijom (0,4ml 10% ketamina i.p. i 0,1ml 2% ksilazina i.p.), podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji sa PFA (paraformaldehidom) i 0,01M PBS (fosfatnim puferom). Zatim su dekapitovani, njihovi mozgovi izolovani, smrznuti tečnim azotom i skladišteni na  $-80^\circ\text{C}$  (171). Režnjevi mozga debljine 35  $\mu\text{m}$  isečeni su na kriotomu i imunohistohemijski tretirani antitelima na eGFP. Režnjevi su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom. Intenziteti fluorescencije kontrola i transfeciranih tkiva su poređeni softverski.

### **4.3 Eksperimentalni dizajn**

Eksperimenti su izvođeni 48 časa nakon implantacije arterijskog katetera (nakon oporavka operisane životinje), u tihom okruženju, na sobnoj temperaturi ( $23^\circ\text{C} \pm 2$ ), na pacovima koji su ispoljavali uobičajeno ponašanje (pijenje vode, jelo, spavanje, lizanje) i koji su prethodno smešteni u pojedinačne kaveze od pleksiglasa dimenzija 25 x 25 x 25 cm.

**Protokol 1 osmišljen je da se ispituju centralni efekti antagonista vazopresinskih  $V_2$  receptora (SR121463) na kardiovaskularne parametre pod bazalnim fiziološkim uslovima.** Doza  $V_2$  antagonista vazopresinskih receptora određena je u prethodnoj studiji (147b). Protokol je izveden na ukupno 18 životinja podeljenih u tri eksperimentalne grupe. U svakoj grupi pacovi su

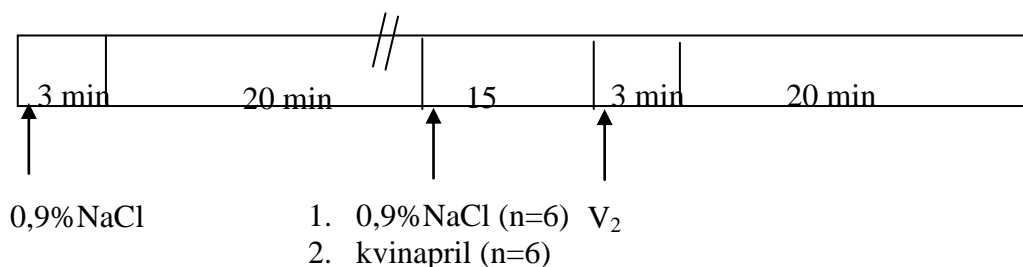
dobili 2 intracerebroventrikularne injekcije. U prvoj grupi prva i druga injekcija su bile rastvarači, a u drugoj i trećoj grupi samo prva injekcija je bila rastvarač (0,9 % NaCl), a druga V<sub>2</sub> antagonist vazopresinskih receptora u dozi od 100 ng, odnosno 500 ng (slika 4). Tri minuta nakon injekcije, perioda neophodnog da se lek distribuira u cerebrospinalnoj tečnosti, snimani su kardiovaskularni parametri (20 minuta). Između injekcija pravljena je pauza od 1h.



Slika 4. Vremenski tok eksperimenata u protokolu 1

Posebnoj grupi od 18 pacova podvrgnutih istom protokolu merena je telesna temperatura.

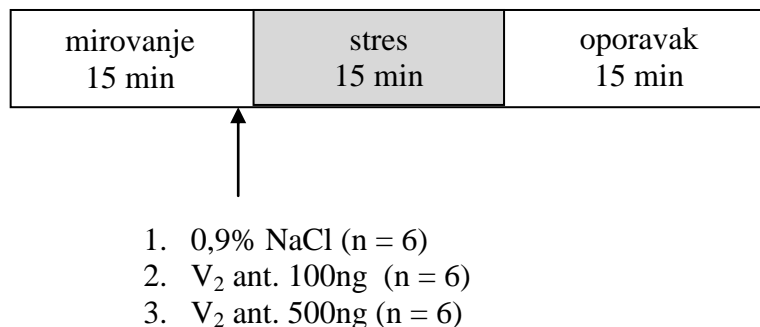
**Protokol 2** osmišljen je da se ispita mehanizam kardiovaskularnih promena izazvanih antagonistom vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora. Antagonist centralnih V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (i.c.v.) izazvao je statističko značajno povećanje oscilacija vrlo niskih frekvencija sistolnog arterijskog pritiska (VLF SAP) i dijastolnog arterijskog pritiska (VLF DAP). Da bismo ispitali mehanizam ovih promena pacovima smo davali inhibitor angiotenzin konvertujućeg enzima, kvinapril. Protokol 2 obuhvatio je 12 životinja koje su podeljene u 2 grupe. Pacovi obe grupe dobili su po 3 injekcije. Prva injekcija bila je 5μl 0,9 % NaCl. Druga injekcija prvoj grupi pacova (n = 6) bila je rastvarač 0,9 % NaCl (5μl ; i.c.v.), a drugoj grupi pacova (n = 6) inhibitor angiotenzin konvertujućeg enzima (ACEI), kvinapril (10 mg/kg; i.p.). Druga injekcija data je sat vremena nakon prve. Treća injekcija, V<sub>2</sub> antagonista (500ng; i.c.v.), data je 10 – 15 minuta nakon druge injekcije (slika 5). Posle prve i treće injekcije snimani su kardiovaskularni parametri u trajanju od 20 minuta.



Slika 5. Vremenski tok ekperimenata u protokolu 2

Posebnoj grupi od 12 pacova podvrgnutih istom protokolu merena je telesna temperatura.

**Protokol 3** osmišljen je da se ispita efekat blokade centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na kardiovaskularne parametre u stresu imobilizacijom. Broj životinja u protokolu tri obuhvatio je 18 pacova koje su podeljene u 3 eksperimentalne grupe. Svim pacovima je data po jedna injekcija (5 μl ; i.c.v.). Prva grupa pacova dobila je 0,9 % NaCl (n = 6). Druga i treća grupa pacova dobile su antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u dve doze, 100 ng (n = 6) i 500ng (n = 6). Zatim su pacovi izloženi stresu imobilizacijom korišćenjem imobilizatora od pleksiglasa (6 cm širine i 4 cm visine) u trajanju od 15 minuta, nakon čega je sledio period oporavka (slika 6). Kardiovaskularni parametri su snimani u toku mirovanja, u toku stresa i u toku oporavka od stresa.



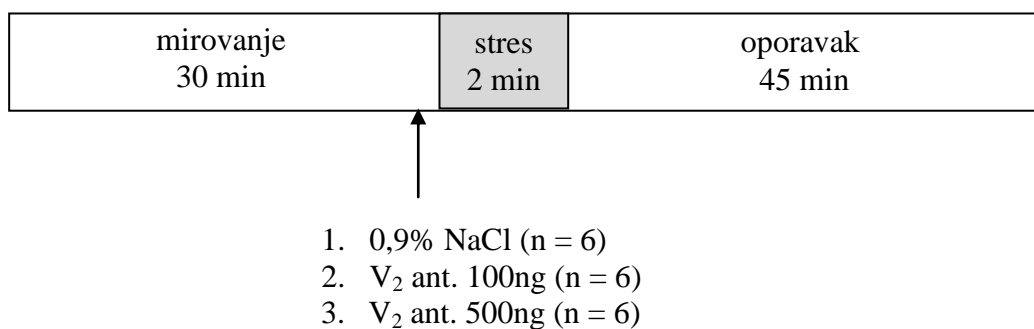
Slika 6. Vremenski tok ekperimenata u protokolu 3

Posebnoj grupi od 18 pacova podvrgnutih istom protokolu merena je telesna temperatura.

**Protokol 4** osmišljen je da se ispita uloga blokade centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na arterijski pritisak i srčanu frekvencu u stresu mlazom vazduha (*air jet* stresu). Broj životinja u protokolu četiri obuhvatio je 18 životinja koje su podeljene u 3 eksperimentalne grupe. Svim



pacovima data je po jedna injekcija (5 $\mu$ l ; i.c.v.). Prva grupa pacova dobila je 0,9% NaCl (n = 6). Druga grupa pacova dobila je antagonistu V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u dozi od 100 ng (n = 6), a treća u dozi od 500ng (n = 6). Zatim su pacovi izloženi stresu mlazom vazduha (pod pritiskom od 1bara) u trajanju od 2 minuta. Nakon stresa sledio je period oporavka (slika 7). Kardiovaskularni parametri snimani su tokom mirovanja, tokom stresa mlazom vazduha i tokom oporavka od stresa, ali su **analizirani samo signali snimani tokom mirovanja i oporavka od stresa zbog specifičnosti signala snimanog tokom samog stresa mlazom vazduha.**



Slika 7. Vremenski tok eksperimenata u protokolu 4

**Protokol 5** osmišljen je da se izvrši morfološka karakterizacija paraventrikularnog jedra. U toku prethodnih eksperimentalnih protokola (1 – 4) paralelno su vađeni mozgovi odgovarajućih kontrolnih životinja (po tri mozga za svaki protokol; n = 12), postavljeni su u metalne kalupe za sečenje ovog materijala (brain matrix) i isečeni su uzorci mozga zapremine 5mm<sup>3</sup>. Potom je uzorak podvrgnut standardnoj histološkoj proceduri: fiksacija u 4% formalinu, ispiranje u tekućoj vodi, dehidratacija alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljavanje ksilolom, kalupljenje u paraplustu. Tako ukalupljeni materijal sečen je na mikrotomu (debljina isečka od 4 $\mu$ m). Svaki isečak postavljen je na histološku pločicu i parafin je uklonjen potapanjem pločice u ksilol. Iseći su potom hidratisani upotrebom alkohola opadajuće koncentracije i tada su bili pripremljeni za bojenje. Od boja je korišćeno rutinsko bojenje hematoksilinom i eozinom (Haematoxylin i Eosin; HE). Rezultat tog bojenja su plavičasto-ljubičasto obojena jedra neurona i ribozomi, a crvenkasto-roze obojena je citoplazma. Korišćene su i specijalne metode bojenja: tioninom (Thionin), bojenje Van Gieson-om i krezil fast violet (Cresyl Fast Violet) bojenje, kao vrste

specijalnih bojenja koje najbolje ističu morfološke karakteristike moždanog tkiva (26, 37, 147, 152, 160, 175). Specijalnim bojenjem tioninom (Thyonin) plava boja tionina se vezuje za kisele proteine i nukleinske kiseline sa specifičnošću koja je determinisana vrednošću pH rastvora za bojenje. Bojenjem po Van Giesonu rezultat bojenja su plavo-crno obojena jedra, crveno obojeni elementi kolagena i žuto obojena ostala tkiva. Specijalnim bojenjem krezil fast violet (Cresyl fast Violet) Nissl-ova supstanca neurona se boji od ljubičaste do tamno plave, citoplazma je svetlo ljubičasta i jedra su obojena plavo. Histološki preparati su posmatrani pod mikroskopom (Leitz Wetzlar Germany Type 307-148.002) i slikani digitalnom kamerom model ART Cam-500M1. Potom je na slikama menjano svetlo, kontrast, oštrina i balans boja korišćenjem Adobe Photoshop CS programa (San Jose, CA).

**Protokol 6 osmišljen je da se ispituju efekti hiperekspresije vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u paraventrikularnom jedru na kardiovaskularnu funkciju pod bazalnim uslovima.** Na 12 životinja sa implantiranim radiotelemetrijskim transponderima za registraciju krvnog pritiska i srčane frekvence nakon oporavka od 7 - 10 dana urađena je transfekcija u paraventrikularno jedro adenovirusa sa genima za ekspresiju V<sub>2</sub> receptora i markerom eGFP čiji je produkt protein koji fluorescira zeleno tj. Ad.CMV.eGFP i Ad.CMV.V2 (eksperimentalna grupa ; n = 6) ili adenovirusima samo sa eGFP tj. Ad.CMV.eGFP (kontrolna grupa ; n = 6). Nakon 2 - 3 nedelje registrovan je krvni pritisak u bazalnim uslovima.

Ekspresija vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora imunohistohemijski je dokazana korišćenjem antitela na eGFP (enhanced green fluorescent protein) koja su transfecirana zajedno sa replikaciono-deficijentnim adenovirusnim vektorima Ad.CMV.V2. Pacovi anestezirani kombinovanom ketamin ksilazinskom anestezijom (0,3ml 10% ketamina i.p. i 0,1ml 2% ksilazina i.p.) prvo su perfundovani sa 0,1M fosfatnim puferom (PBS ; pH 7,4) koji je sadržao heparin (1000 U/L), pa sa 4% rastvorom paraformaldehida. Potom im je izolovan mozak i fiksiran u istom fiksativu 48h na 4°C. Tkivo je zatim potopljeno u 20% saharozu u 0,1M PBS 48h na 4°C da bi ga zaštitili od oštećenja prilikom smrzavanja. Zatim su mozgovi brzo smrzavani u suvom ledu. Smrznuti mozgovi preneseni su u laboratoriju prof. Davida Murpheya na Univerzitetu u Bristolu, u Velikoj Britaniji, gde je ostatak protokola uradila asist. dr Maja Lozić. Mозgovi su sečeni na

kriostat (Leica CM3050, Nussloch, Germany) na reznjive debljine 35 $\mu$ m. Reznjevi su potom dva puta ispirani u 0,1M PBS-u koji je sadržao triton X-100. Zatim su reznjevi inkubirani u anti eFGP antitelima (Abcam, USA; rastvorena 1:20000). Posle ponovnog ispiranja u 0,1M rastvoru reznjevi su montirani na staklene pločice i pokriveni hidrofilnim vezujućim medijem (Tris-HCl koji sadrži polivinil alkohol i glicerol). Pripremljeni preparati posmatrani su pod konfokalnim mikroskopom (LSM510, Carl-Zeiss Co Ltd., Jena, Germany).

#### **4.4 Registovanje i obrada signala pulsog arterijskog krvnog pritiska**

Za registovanje i obradu kardiovaskularnih signala pacova korišćeni su softveri « Anapres<sup>®</sup> » (Notocord Systems, Francuska), « Dataquest A.R.T. 4,0 » (Transoma Medical, data Science International, SAD) i « BP Complete », izrađen u laboratoriji. Arterijski pulsni pritisak digitalizovan je frekvencijom od 1000 Hz i podvrgnut je daljoj obradi.

##### Analiza kardiovaskularnih signala u vremenskom domenu

Iz arterijskog pulsog talasa izvedeni su sistolni arterijski pritisak (SAP) kao maksimumi, dijastolni arterijski pritisak (DAP) kao minimumi i srčana frekvencija (SF) kao recipročna vrednost pulsog intervala (PI) koji predstavlja interval između dva maksimuma arterijskog pulsog talasa.

U protokolu 4 zbog specifičnog oblika promene pritiska i srčane frekvence u vremenu dodali smo analizi sledeće parametre:

- 1) intezitet odgovora krvnog pritiska i srčane frekvence tj. njihov integral  $\int_{SAP}$ ,  $\int_{DAP}$  i  $\int_{SF}$ ;
- 2) maksimalni porast krvnog pritiska i srčane frekvencije  $SAP_{max}$ ,  $DAP_{max}$ ,  $SF_{max}$ ;
- 3) latentni period (period koji prodje od početka stresa do postizanja maksimalnih vrednosti krvnog pritiska i srčane frekvencije),  $LAT_{SAP}$ ,  $LAT_{DAP}$  i  $LAT_{SF}$ ;
- 4) oporavak nakon stresa (vreme koje prodje od završetka stresa do povratka vrednosti krvnog pritiska i srčane frekvencije na bazalne vrednosti).

##### Frekvencijalna analiza kardiovaskularnih signala

Ekvidistantno uzorkovanje SAP, DAP i SF, i podsemplovanje na 20 Hz, omogućava nam direktnu spektralnu analizu korišćenjem algoritma brze Fourier-ove transformacije (FFT) u

vremenskim serijama od 2048 tačaka sa Niquist-ovom frekvencijom od  $1 / 2\sigma t = 1 / (2 \times 0,05) = 10\text{Hz}$  (prvi harmonik) gde je „ $\sigma t$ “ = 0,05s brzina uzorkovanja signala što odgovara frekvenciji od 20Hz, a „n“ broj odabranih vremenskih serija od 2048 tačaka. Spektar kroz vreme generiše se sa 30 pojedinačnih spektara od 2048 tačaka sa preklapanjem, odnosno fiksnim vremenskim pomerajem od 211 tačaka (ili  $211 \times 0,05\text{s} = 10,55\text{s}$ ). Celokupno analizirani signal obuhvatao je 8192 tačaka ili 410 sekundi (oko 7 min). Pre analize, signal krvnog pritiska i srčane frekvencije je detrendovan i otklonjen je linearan trend (19) provlačenjem kroz Hanningov prozor od 15 tačaka. Spektar smo analizirali do 3Hz.

Osim srednjih vrednosti sistolnog i dijastolnog arterijskog pritiska, i srčane frekvence, kao vremenskih parametara u analizi kardiovaskularnih signala koristili smo i frekvencijalnu analizu.

Kvantifikacija promena u celom spektru (totalni volumen; TV = 0,00976-3Hz) ili u njegove tri frekvencijalne zone:

- 1) zona veoma niskih frekvencija (*very low frequency*; VLF = 0,00976 -0,195Hz),
- 2) zona niskih frekvencija (*low frequency*; LF = 0,195-0,8Hz) i
- 3) zona visokih frekvencija (*high frequency*; HF = 0,8-3Hz),

uradjena je sabiranjem modula harmonika ispod 30 FFT kriva u gore definisanim frekvencijalnim opsezima, i izražena u  $\text{mmHg}\cdot\text{Hz}^{-1/2}$  za arterijski krvni pritisak ili  $\text{bpm}\cdot\text{Hz}^{-1/2}$  za srčanu frekvenciju. Visokofrekventnu zonu (HF) čine oscilacije koje nastaju mehaničkim uticajem respiracije na cirkulaciju. Varijacije srčane frekvence nastale uticajem respiracije se zovu respiratorna sinus aritmija (RSA) i one odgovaraju HF komponenti spektra srčane frekvence. RSA nastaje centralnom integracijom dejstva vagusa, s jedne strane, i baro- i hemorefleksa, s druge strane (94, 111). HF komponenta KP je pod mehaničkim uticajem respiracije (94, 131, 181) i promena centralnog volumena krvi (69, 110, 181), kao i samog delovanja HF SF (181). LF komponenta KP nastaje pod uticajem simpatičkog nervnog sistema (SNS) i baroreceptorskog refleksa (36, 109), a LF SF je pod uticajem vagusa i simpatikusa. Za VLF KP i VLF SF komponente odgovorni su renin angiotenzinski sistem (RAS), neuropeptid vazopresin, endotelni faktor relaksacije azot monoksid (NO), enteralni i renalni protok krvi, protok krvi kroz kožu, termoregulacija itd. (6, 7). Količnik LF i HF oscilacija (LF/HF<sub>SF</sub> indeks) je mera simpatovagalnog balansa na nivou srca (159). U bazalnim fiziološkim uslovima, kod kontrolnih

neanestetisanih pacova uočili smo da doprinos VLF i LF komponenti varijabilitetu krvnog pritiska iznosi  $\geq 60\%$ .

#### **4.5 Statistička obrada podataka**

Za statistička poredjenja kontrola i tretiranih životinja korišćeni su Studentov parni t – test, dvosmerna analiza varijanse sa ponavljenim merenjima (ANOVA repeated measures) i *post hoc* Bonferroni test. Statistička obrada podataka urađena je u programu „GraphPad Prism verzija 4“ (GraphPad Software, Inc.San Diego, Kalifornija, SAD; br. licence je GPW4-014944-RFB-8180). Razlike izmedju kontrola i tretiranih životinja smatrane su značajnim samo za vrednosti  $p < 0,05$ .

#### **4.6 Korišćene supstancije**

Korišćeni su selektivni V<sub>2</sub> (SR121463) antagonist vazopresinskih receptora („Sanofy-Synthélabo“, Aventis, Tuluz, Francuska), [Arg8]-vazopresin acetat naručen iz „Sigma-Aldrich“ (SAD), tiopental sodium injekcije iz „Rotexmedica“ (Trittau, Nemačka), neomicin bacitracin sprej i penicilin injekcije iz „Galenike a.d.“ (Beograd) i halotan koji smo dobili od „Jugoremedije“ (Beograd). Ketamin i ksilazin naručeni su iz „Richter Pharma“ (Wels, Austrija) i „Ceva Santé Animal“ (Budimpešta, Madjarska). Metamizol sodium i kvinapril hlorid smo naručili od „Hemofarma Koncern a.d.“ (Vršac). Koristili smo i neomicin bacitracin sprej (Enbecin<sup>®</sup> aerosip; „Galenika a.d.“, Beograd). Vazopresin i V<sub>2</sub> antagonista su rastvarani u 0,9% NaCl rastvoru („Hemofarm Koncern a.d.“). Korišćena su i eGFP antitela („Abcam“, SAD) i replikaciono-deficijentni adenovirusni vektori Ad.CMV.eGFP i Ad.CMV.V2 koji su napravljeni u saradnji sa laboratorijom prof. Davida Murphya na Univerzitu u Bristolu. Za histološke metode bojenja korišćeni su ksilol („Hemos“, Beograd), apsolutni etanol i 95-96% etanol („Zorka Pharma a.d.“, Šabac), Majerov hematoksilin („Bio-optica“, Milano, Italija), formalin („Alfapanon“, Novi Sad), anhidrovani natrijum acetat (Hemijski institut, Beograd), ponceau ksilidin („Sigma-Aldrich“, Japan), sirćetna kiiselina („Riedel-deHaen“, Nemačka), kiseli fuksin

(„Sigma-Aldrich“, SAD), krezil fast violet („Sigma-Aldrich“, SAD), tionin („Himedia“, Indija),  
eozin („Sigma-Aldrich“, SAD).

## **5 REZULTATI**

### **5.1. Efekti antagonistu V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora na kardiovaskularni sistem u bazalnim fiziološkim uslovima**

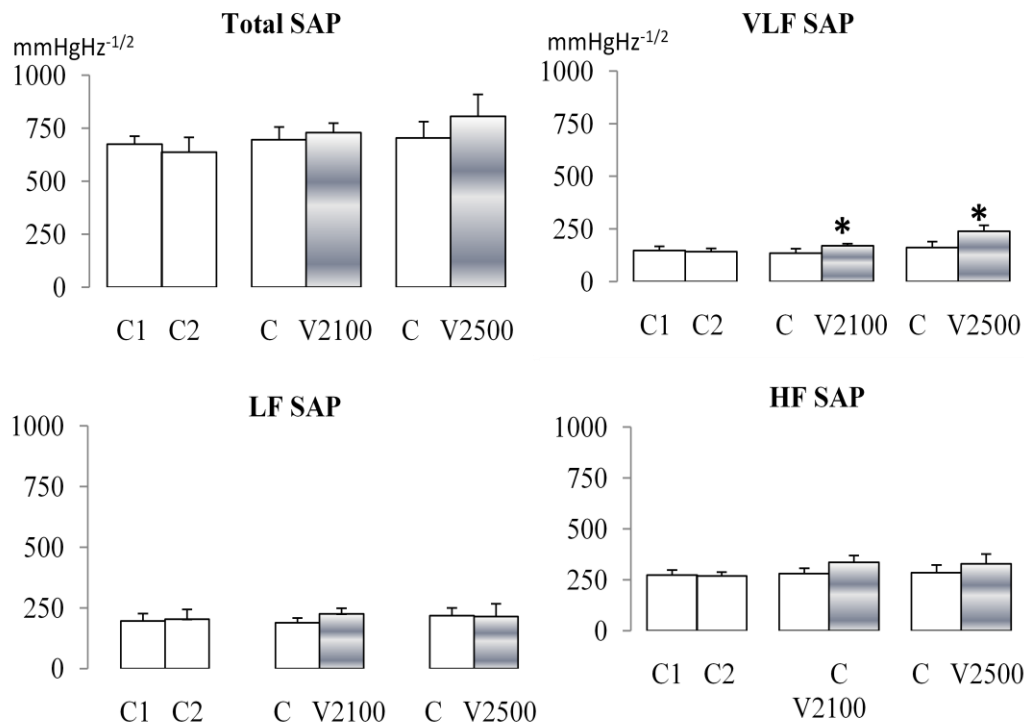
U tabeli 1 antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora, ubrizgan intracerebroventrikularno budnim pacovima, u bazalnim fiziološkim uslovima, u dozama od 100ng (n = 6) i 500ng (n = 6), nije izazvao statistički značajne promene sistolnog (SAP) i dijastolnog arterijskog pritiska (DAP), kao ni srčane frekvence (SF).

**Tabela 1. Efekti antagonistu V<sub>2</sub> receptora vazopresina ubrizganog intracerebroventrikularno neanestetisanim pacovima na krvni pritisak i srčanu frekvenciju**

parametar	kontrola		V <sub>2</sub> 100		V <sub>2</sub> 500	
	5μl 0,9 %NaCl	5μl 0,9 %NaCl	5μl 0,9 %NaCl	V2 (100ng)	5μl 0,9 %NaCl	V2 (500ng)
SAP (mmHg)	126,7 ± 4,8	121,0 ± 4,3	123,9 ± 3,8	129,7 ± 6,8	121,7 ± 3,9	126,0 ± 3,7
DAP (mmHg)	86,8 ± 4,4	87,0 ± 5,0	84,0 ± 3,5	84,4 ± 3,9	81,0 ± 6,0	82,9 ± 6,2
SF (bpm)	371,7 ± 12,2	370,5 ± 17,1	401,0 ± 7,8	404,1 ± 13,5	398,0 ± 18,0	413,5 ± 17,4

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M.. Sistolni arterijski pritisak (SAP), dijastolni arterijski pritisak (DAP) i srčana frekvencija (SF)

Na grafikonu 1 antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora je, u obe doze (100ng i 500ng; i.c.v.) izazvao statistički značajan porast oscilacija veoma niskih frekvenci (VLF SAP) dok na ostale komponente sistolnog arterijskog pritiska (LF SAP i HF SAP) nije imao uticaja.



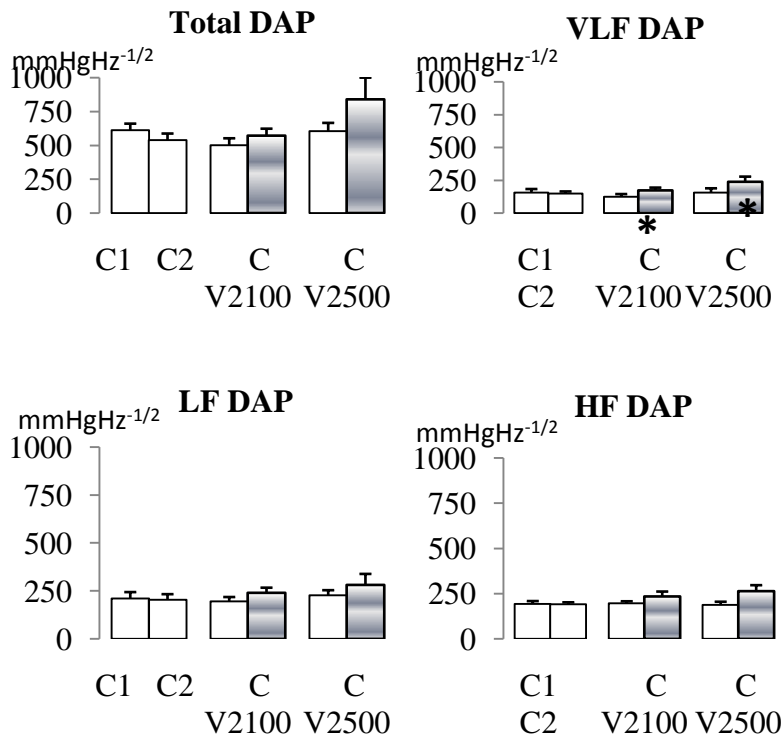
**Grafikon 1. Efekti antagonista  $V_2$  receptora vazopresina ubrizganog intracerebroventrikularno neanestetisanim pacovima na komponente varijabiliteta sistolnog arterijskog pritiska (SAP)**

Antagonist  $V_2$  receptora vazopresina izazvao je porast VLF komponente SAP.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (C, C1, C2; i.c.v. injekcije 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); sivo dezenirani stubići predstavljaju doze od 100ng i 500ng antagoniste  $V_2$  vazopresinskih receptora; SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija. \*  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću kontrolu (C).

Na grafikonu 2 antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora je, u obe doze (100ng i 500ng; i.c.v.), izazvao statistički značajan porast oscilacija veoma niskih frekvenci (VLF DAP) dok na ostale komponente dijastolnog arterijskog pritiska (LF SAP i HF SAP) nije imao uticaja.



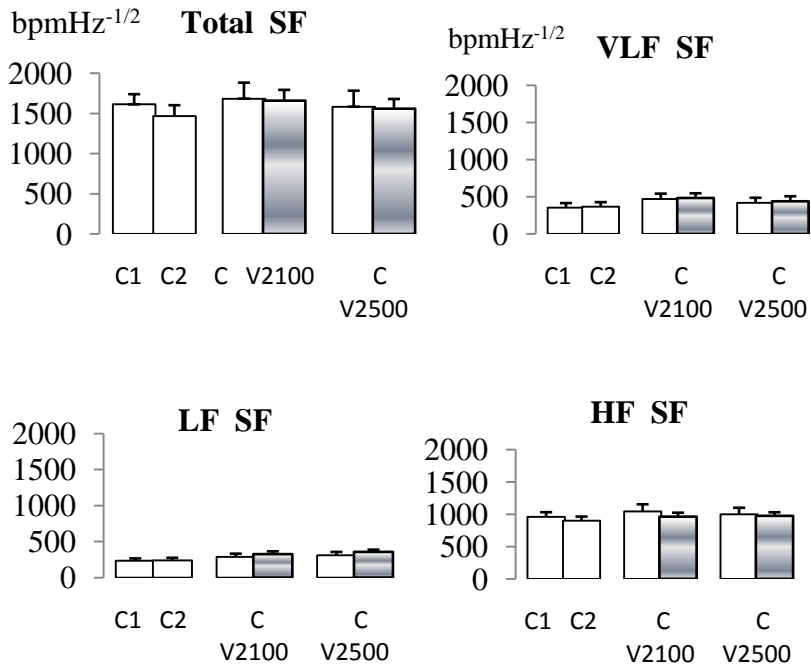


**Grafikon 2. Efekti antagonista V<sub>2</sub> receptora vazopresina ubrizganog intracerebroventrikularno neanestetisanim pacovima na komponente varijabiliteta dijastolnog arterijskog pritiska (DAP)**

Antagonist V<sub>2</sub> receptora vazopresina je izazvao porast VLF komponente DAP.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (C, C1, C2; i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo dezenirani stubići predstavljaju doze od 100ng i 500ng antagoniste V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora; DAP: dijastolni arterijski pritisak; Total DAP: ukupni varijabilitet; VLF DAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF DAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF DAP: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću kontrolu (C).

Na grafikonu 3 antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora, ubrizgan intracerebroventrikularno, nije izazvao statistički značajne promene komponenti varijabiliteta srčane frekvence (SF).



**Grafikon 3. Efekti antagonista V<sub>2</sub> receptora vazopresina ubrizganog intracerebroventrikularno neanestetisanim pacovima na komponente varijabiliteta srčane frekvence (SF)**

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (C, C1, C2; i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo dezenirani stubići predstavljaju doze od 100ng i 500ng antagoniste V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora; SF: srčana frekvencija; Total SF: ukupni varijabilitet; VLF SF: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SF: varijabilitet niskih frekvencija; HF SF: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću kontrolu (C).

U tabeli 2 prikazane su promene vrednosti telesne temperature (°C) nakon ubrizgavanja fiziološkog rastvora (5μl; i.c.v.), što je predstavljalo kontrolu, zatim antagoniste vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 100ng ili 500ng. Analiza dobijenih rezultata pokazala je da blokada centralnih V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u dozi od 100ng i u dozi od 500ng nije izazvala statistički značajne promene telesne temperature (°C).

**Tabela 2. Efekti antagonista V<sub>2</sub> receptora vazopresina ubrizganog intracerebroventrikularno neanestetisanim pacovima na temperaturu**

Tretman(5μl;i.c.v.)	0,9% NaCl	100ng V <sub>2</sub>	0,9% NaCl	500ng V <sub>2</sub>
T ( ° C)	36,0 ± 1,0	35,5 ± 1,0	34,7 ± 0,9	33,5 ± 2,1

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M.. T ( □ C )

### **5.2 Efekti antagonista vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na kardiovaskularni sistem pod blokadom renin angiotenzinskog sistema**

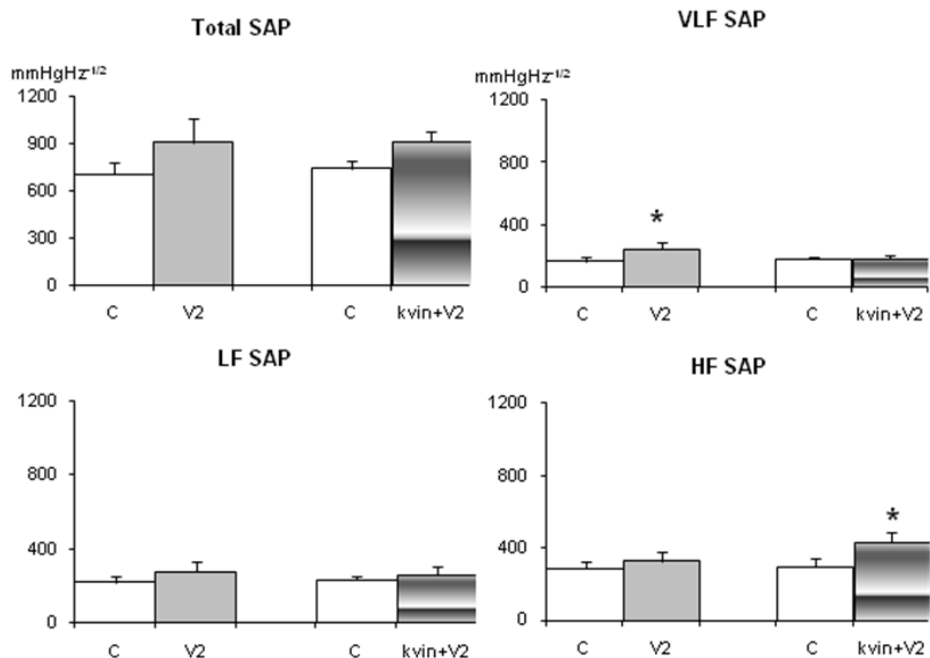
U tabeli 3 statistički značajno smanjenje sistolnog arterijskog pritiska (SAP; p < 0,05), kao i porast srednje vrednosti srčane frekvencije (SF; p < 0,01), u odnosu na netretirane pacove, posledica su dejstva inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima, kvinaprila (nije prikazano zbog opterećenosti tabele), što ubrizgavanje vazopresinskog V<sub>2</sub> antagonista nije izmenilo (tabela 2).

**Tabela 3. Efekti antagonista V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) na arterijski pritisak i srčanu frekvenciju u prisustvu inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima, kvinaprila (10mg/kg; i.p.)**

Eksper. grupa	V <sub>2</sub>		kvinapril + V <sub>2</sub>	
	5μl 0,9 %NaCl	5μl V <sub>2</sub> (500 ng)	5μl 0,9 %NaCl	5μl kvinapril +V <sub>2</sub> (500 ng)
<b>SAP (mmHg)</b>	131,70 ± 3,94	135,98 ± 3,72	131,70 ± 3,94	114,73 ± 10,16*†
<b>DAP (mmHg)</b>	80,98 ± 6,02	82,85 ± 6,21	80,98 ± 6,02	78,34 ± 8,41
<b>SF (bpm)</b>	397,79 ± 13,73	413,50 ± 17,42	397,79 ± 13,73	456,67 ± 18,01**

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M.. Sistolni arterijski pritisak (SAP), dijastolni arterijski pritisak (DAP) i srčana frekvencija (SF). \* p < 0,05 u odnosu na 0,9% NaCl, \*\* p < 0,01 u odnosu na 0,9% NaCl; † p < 0,05 u odnosu na V<sub>2</sub>.

Na grafikonu 4 statistički značajan porast oscilacija visoke frekvencije (HF SAP) (p < 0,05) u odnosu na netretirane pacove je efekat kvinaprila (zbog opterećenosti tabele nije prikazano) koji ubrizgavanje V<sub>2</sub> antagonista nije izmenilo.

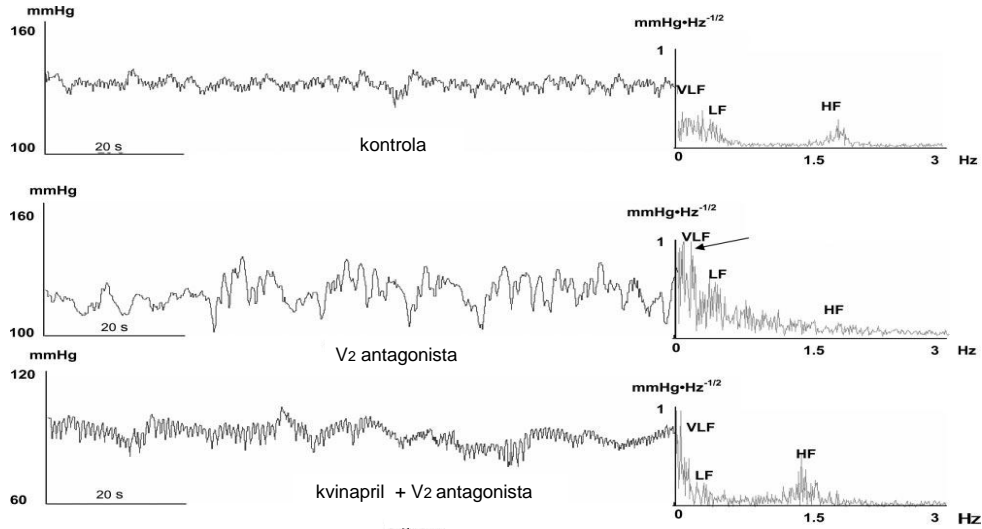


**Grafikon 4. Efekti antagonista  $V_2$  vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) na komponente varijabiliteta sistolnog arterijskog pritiska (SAP) u prisustvu ECEI, kvinaprila (kvin; 10mg/kg; i.p.)**

Kvinapril sprečava porast VLF SAP koji izaziva antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići predstavljaju dozu od 500ng antagoniste  $V_2$  vazopresinskih receptora; horizontalno šrafirani stubići predstavljaju pacove kojima je prvo dat kvinapril (10mg/kg injekcija i.p.), pa pola sata kasnije 500 ng antagoniste  $V_2$  vazopresinskih receptora (i.c.v.); SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija. \*  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću kontrolu (C).

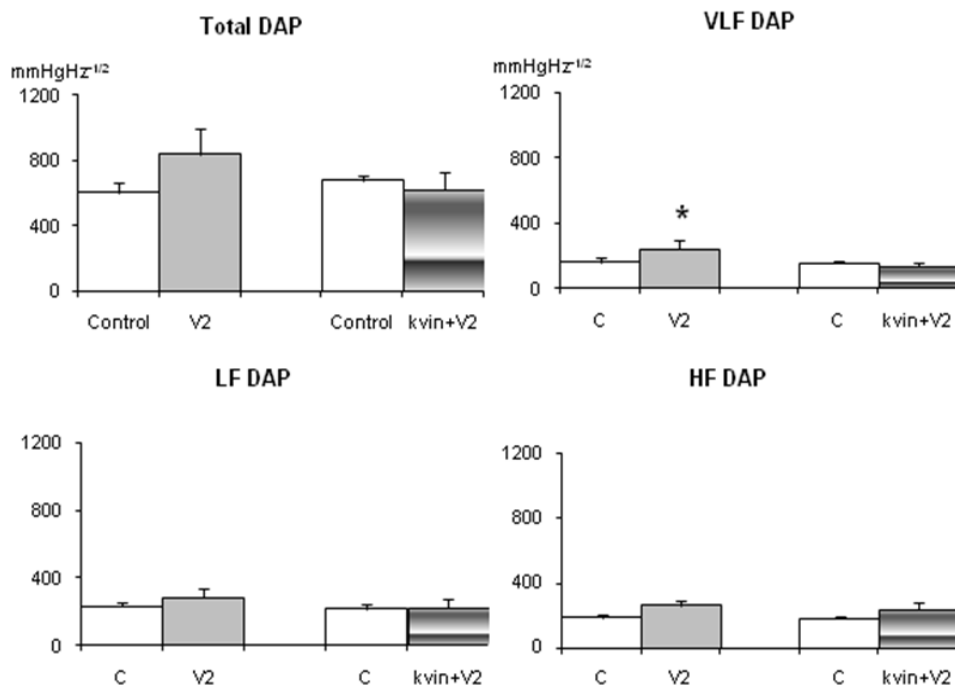
Na slici 9 prikazan je tipičan eksperiment u kome je pretretiranje pacova kvinaprilom sprečilo porast oscilacija vrlo niske frekvencije izazvane antagonistom  $V_2$  receptora, ali je istovremeno dovelo i do porasta oscilacija visoke frekvencije (HF SAP) u odnosu na netretiranog pacova što predstavlja efekat kvinaprila (nije pokazano) na koji antagonist  $V_2$  receptora nije imao uticaja.



**Slika 9. Karakteristični efekti antagonista  $V_2$  vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) na komponente varijabiliteta sistolnog arterijskog pritiska (SAP) u prisustvu kvinaprila (kvin; 10mg/kg; i.p.)**

Leva strana slike: signali sistolnog arterijskog pritiska jednog pacova; desna strana slike: odgovarajući spektri SAP; gornji deo slike: SAP i njegov spektar tokom kontrole (i.c.v. injekcija 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); srednji deo slike: SAP i njegov spektar nakon davanja  $V_2$  antagoniste (500ng injekcija; i.c.v.); donji deo slike: SAP i njegov spektar kada je davanju  $V_2$  antagoniste prethodila injekcija kvinaprila (10mg/kg injekcija; i.p.); VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija.

Na grafikonu 5 pretretiranje pacova kvinaprilom sprečilo je porast oscilacija vrlo niske frekvencije dijastolnog arterijskog pritiska (VLF DAP) nastalog dejstvom antagonista  $V_2$  receptora, dok na ostale zone oscilacija dijastolnog arterijskog pritiska nije imalo uticaja (grafikon 5).

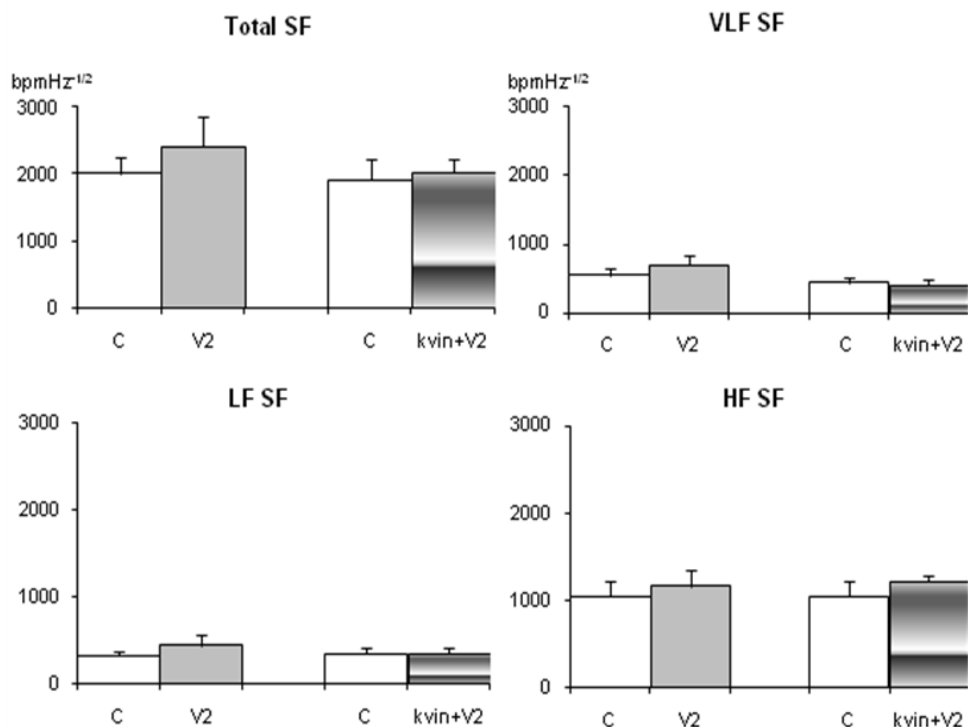


**Grafikon 5. Efekti antagonista V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) na komponente varijabiliteta dijastolnog arterijskog pritiska (DAP) u prisustvu inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima, kvinaprila (kvin; 10mg/kg; i.p.).**

Kvinapril sprečava porast VLF DAP koji izaziva antagonist V<sub>2</sub> receptora.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići predstavljaju dozu od 500ng antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora; horizontalno šrafirani stubići predstavljaju pacove kojima je prvo dat kvinapril (10 mg/kg injekcija i.p.), pa pola sata kasnije 500ng antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (i.c.v.); SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencijacija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću kontrolu.

Na grafikonu 6 antagonist centralnih V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora nije izazvao statistički značajne promene varijabiliteta srčane frekvencije kod pacova koji su prethodno tretirani ACEI, kvinaprilom, u odnosu na pacove koji nisu tretirani (grafikon 6).



**Grafikon 6. Efekti antagonista V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) na komponente varijabiliteta srčane frekvencije (SF) u prisustvu inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima, kvinaprila (kvin; 10mg/kg; i.p.).**

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići predstavljaju dozu od 500ng antagoniste V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora; horizontalno šrafirani stubići predstavljaju pacove kojima je prvo dat kvinapril (10 mg/kg; i.p.), pa pola sata kasnije 500ng antagoniste V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (i.c.v.); SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija

U tabeli 4 antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) nije izazvao statistički značajne promene srednjih vrednosti telesne temperature kod pacova pretretiranih kvinaprilom (10mg/kg; i.p.), kao ni sam kvinapril (10mg/kg; i.p.), u odnosu grupu pacova kojoj je dat fiziološki rastvor (i.c.v.) (tabela 3).



**Tabela 4. Efekti antagonista V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora (500ng; i.c.v.) na telesnu temperaturu (T) u prisustvu inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima, kvinaprila (10mg/kg; i.p.)**

Tretman (5μl; i.c.v.)	0,9% NaCl	V2 (500 ng; i.c.v.)	kvinapril + 500ngV <sub>2</sub>
T (°C)	36,8 ± 0,2	36,4 ± 0,3	36,0 ± 0,8

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M..

### **5.3 Efekti blokade vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na kardiovaskularni sistem pri izlaganju stresu imobilizacijom**

Rezultati dobijeni tokom izlaganja pacova stresu imobilizacijom nakon blokade vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora prikazani su u tabelama 3 i 4 i na grafikonima 7 – 12.

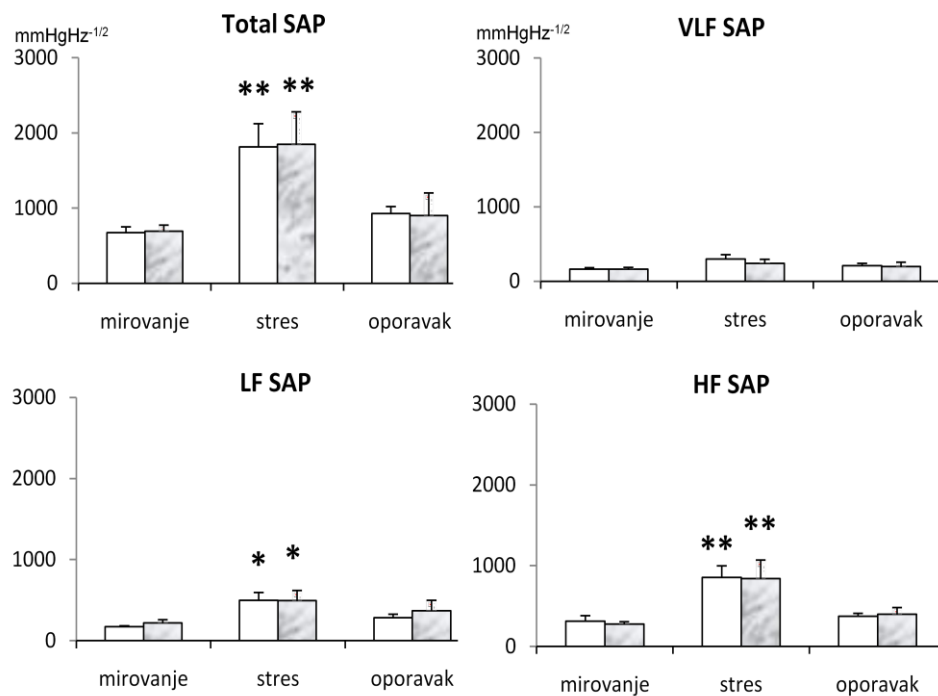
U tabeli 5 stres imobilizacijom izazvao je porast sistolnog (SAP) i dijastolnog arterijskog pritiska (DAP) na koji antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) nije imao uticaja. Uz to, antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora potencirao je povećanje srčane frekvence (SF) u toku stresa imobilizacijom u odnosu na grupu netretiranih pacova (p < 0,01) (tabela 3).

**Tabela 5. Efekti stresa imobilizacijom na arterijski krvni pritisak i srčanu frekvenciju u prisustvu selektivnog antagonista vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Eksp.grupe	0,9% NaCl			V <sub>2</sub> 100		
	mirovanje	stres imob.	oporavak	mirovanje	stres imob.	oporavak
<b>SAP (mmHg)</b>	133,0 ± 3,5	152,7 ± 5,6**	143,3 ± 4,6	135,0 ± 3,5	150,6 ± 5,0*	145,2 ± 6,0
<b>DAP(mmHg)</b>	83,3 ± 4,0	106,2 ± 5,0**	94,4 ± 3,0	86,6 ± 4,9	99,5 ± 7,2**	91,6 ± 6,5
<b>SF (bpm)</b>	415,8 ± 16,2	445,5 ± 13,1	433,3 ± 17,7	392,2 ± 16,8	455,9 ± 30,1**	430,3 ± 26,7

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M.. Sistolni arterijski pritisak (SAP), dijastolni arterijski pritisak (DAP) i srčana frekvencija (SF). \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

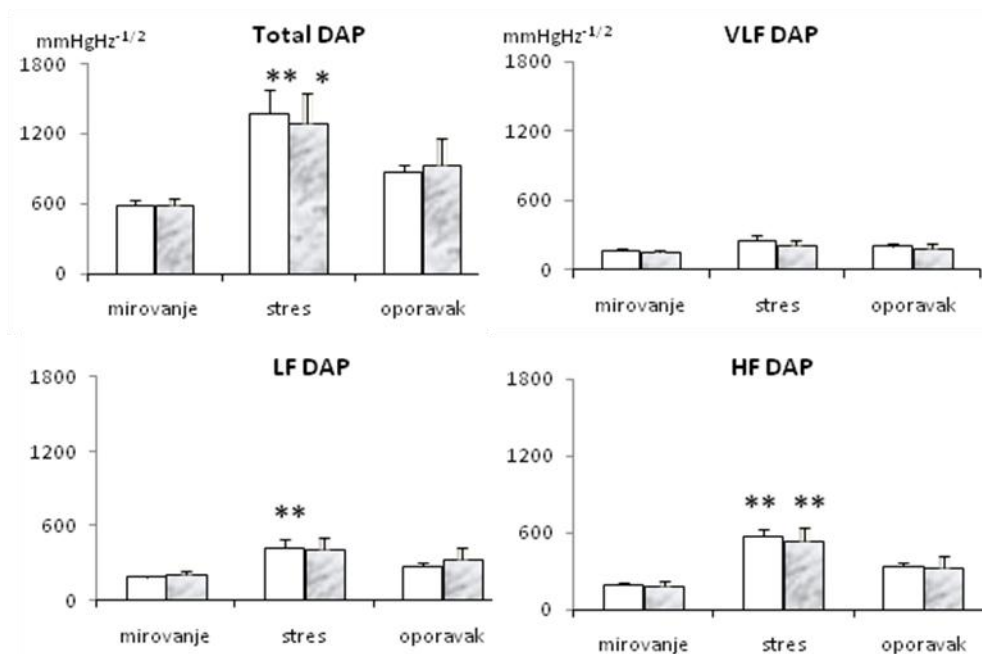
Na grafikonu 7 stres imobilizacijom izazvao je povećanje ukupne sume oscilacija sistolnog arterijskog pritiska (Total SAP), oscilacija niskih (LF SAP) i visokih frekvenci sistolnog arterijskog pritiska (HF SAP). Stres nije imao uticaja na zonu veoma niskih oscilacija sistolnog arterijskog pritiska (VLF SAP). Antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) nije modifikovao efekte stresa imobilizacijom na varijabilitet sistolnog arterijskog pritiska.



**Grafikon 7. Efekti stresa imobilizacijom na komponente sistolnog arterijskog pritiska u prisustvu selektivnog antagonista vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići, u dezinu mermera, predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija SAP. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

Na grafikonu 8 stres imobilizacijom izazvao je porast ukupne sume svih oscilacija dijastolnog krvnog pritiska (Total DAP), oscilacija niskih (LF DAP) i oscilacija visokih frekvencija dijastolnog arterijskog pritiska (HF DAP), dok na oscilacije veoma niskih frekvenci dijastolnog arterijskog pritiska (VLF DAP) nije imao uticaja. Antagonist V<sub>2</sub> receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) nije modifikovao porast ukupne sume svih oscilacija dijastolnog krvnog pritiska (Total DAP) i oscilacija visoke frekvencije (HF DAP), ali je sprečio porast LF zone DAP u toku stresa imobilizacijom (grafikon 8).

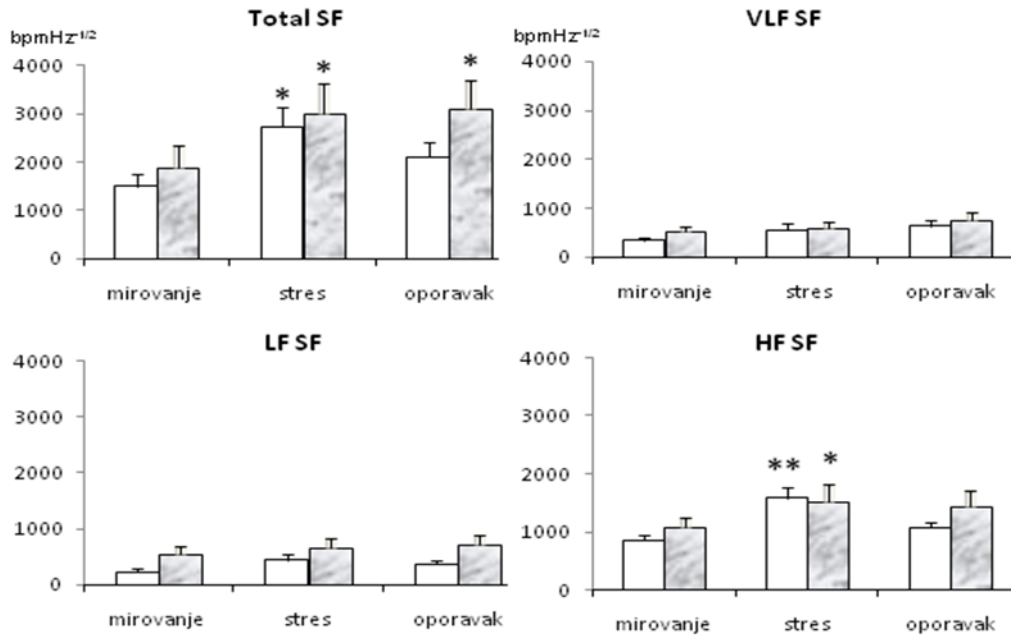


**Grafikon 8. Efekti stresa imobilizacijom na komponente dijastolnog arterijskog pritiska u prisustvu selektivnog antagoniste vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora sprečio je porast LF DAP nastao u toku stresa imobilizacijom.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići, u dezinu mermara, predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. DAP: dijastolni arterijski pritisak; Total DAP: ukupni varijabilitet; VLF DAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF DAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF DAP: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

Na grafikonu 9 stres imobilizacijom izazvao je porast ukupne sume svih oscilacija srčane frekvencije (Total SF) i oscilacija visoke frekvencije srčane frekvence (HF SF) u odnosu na stanje mirovanja, dok na oscilacije veoma niskih (VLF SF) i niskih frekvenci srčane frekvence (LF SF) nije imao uticaja. Antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) nije modifikovao efekte stresa imobilizacijom na varijabilitet srčane frekvence (grafikon 9).



**Grafikon 9. Efekti stresa imobilizacijom na komponente srčane frekvencije u prisustvu selektivnog antagonista vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora povećao je sumu svih oscilacija prilikom oporavka od stresa (Total SF).

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojjeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići, u dezinu mermera, predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. SF: srčana frekvencija; Total SF: ukupni varijabilitet; VLF SF: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SF: varijabilitet niskih frekvencija; HF SF: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

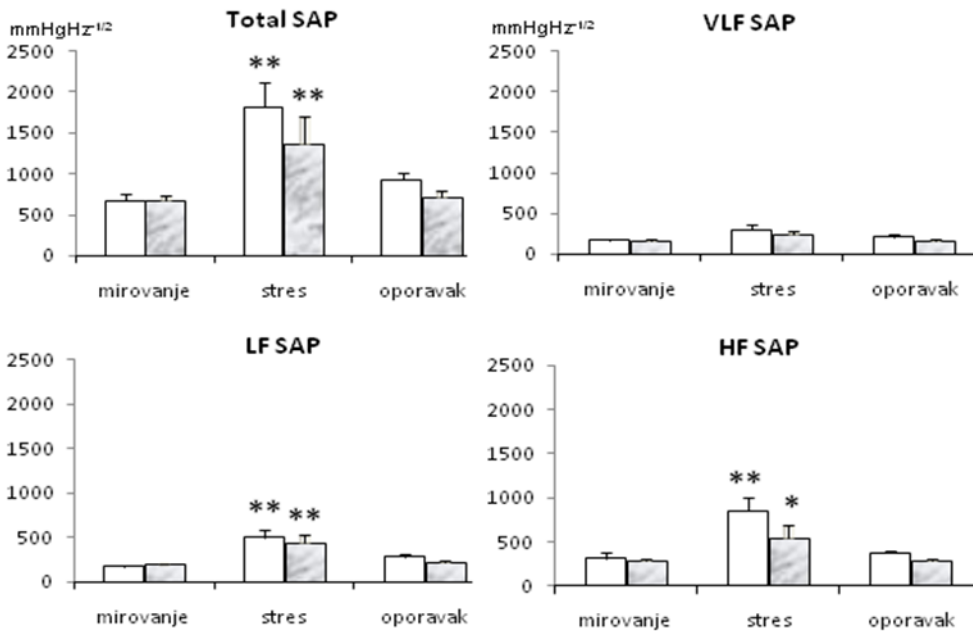
U tabeli 4 stres imobilizacijom izazvao je porast sistolnog (SAP) i dijastolnog arterijskog pritiska (DAP), dok na srčanu frekvencu (SF) nije imao uticaja. Antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora u dozi od 500ng (i.c.v.) nije modifikovao efekte stresa krvni pritisak i srčanu frekvencu (tabela 4).

**Tabela 4. Efekti stresa imobilizacijom na arterijski krvni pritisak i srčanu frekvenciju u prisustvu selektivnog antagoniste vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (500ng; i.c.v.)**

Eksp.grupe	0,9% NaCl			V <sub>2</sub> 500		
	mirovanje	stres imob.	oporavak	mirovanje	stres imob.	oporavak
<b>SAP (mmHg)</b>	133,0 ± 3,5	152,7 ± 5,7**	143,3 ± 4,6	133,6 ± 2,0	147,7 ± 4,4**	140,3 ± 3,0
<b>DAP(mmHg)</b>	83,3 ± 4,0	106,2 ± 5,0**	94,4 ± 3,0	89,5 ± 3,8	105,0 ± 3,5**	94,9 ± 3,8
<b>SF (bpm)</b>	415,8 ± 16,2	445,5 ± 13,1	433,3 ± 17,7	380,1 ± 15,0	416,3 ± 11,3	426,8 ± 14,1

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M.. Sistolni arterijski pritisak (SAP), dijastolni arterijski pritisak (DAP) i srčana frekvencija (SF). \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

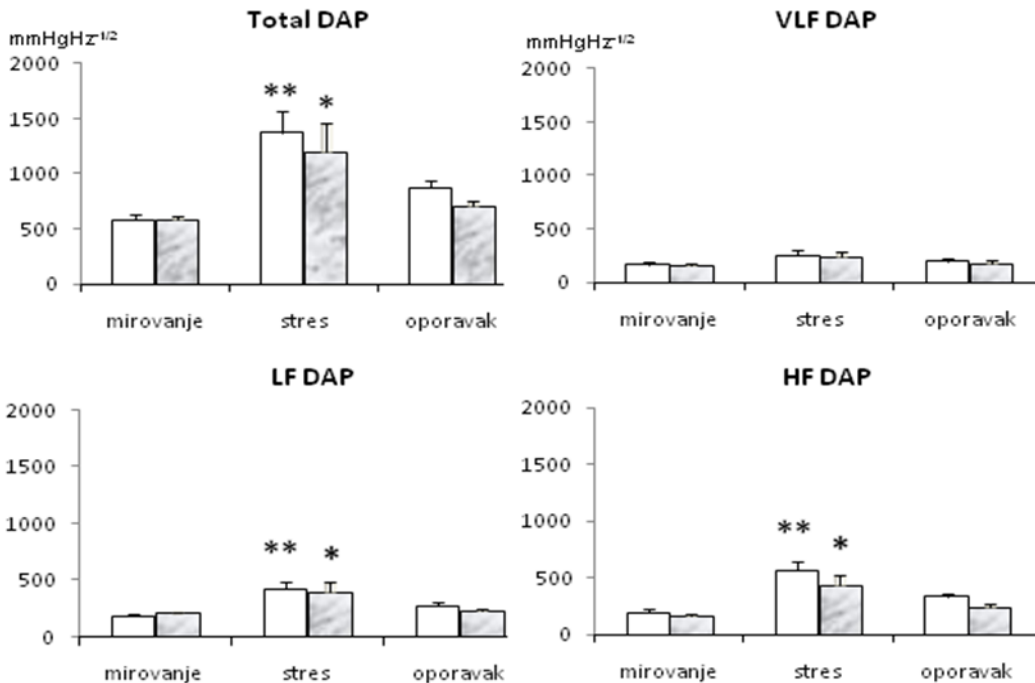
Na grafikonu 10 stres imobilizacijom izazvao je porast ukupne sume svih oscilacija sistolnog arterijskog pritiska (Total SAP), oscilacija niskih frekvenci (LF SAP) i oscilacija visokih frekvenci sistolnog arterijskog pritiska (HF SAP), dok na oscilacije veoma niskih frekvenci (VLF SAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 500ng (i.c.v.) nije modifikovao efekte stresa (grafikon 10).



**Grafikon 10. Efekti stresa imobilizacijom na komponente sistolnog arterijskog pritiska u prisustvu selektivnog antagonista vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (500ng; i.c.v.)**

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići, u dezenu mermera, predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

Na grafikonu 11 stres imobilizacijom izazvao je porast ukupne sume svih oscilacija dijastolnog arterijskog pritiska (Total DAP), oscilacija niskih frekvenci (LF DAP) i oscilacija visokih frekvenci dijastolnog arterijskog pritiska (HF DAP), dok na oscilacije veoma niskih frekvenci (VLF DAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 500ng (i.c.v.) nije modifikovao efekte stresa (grafikon 11).



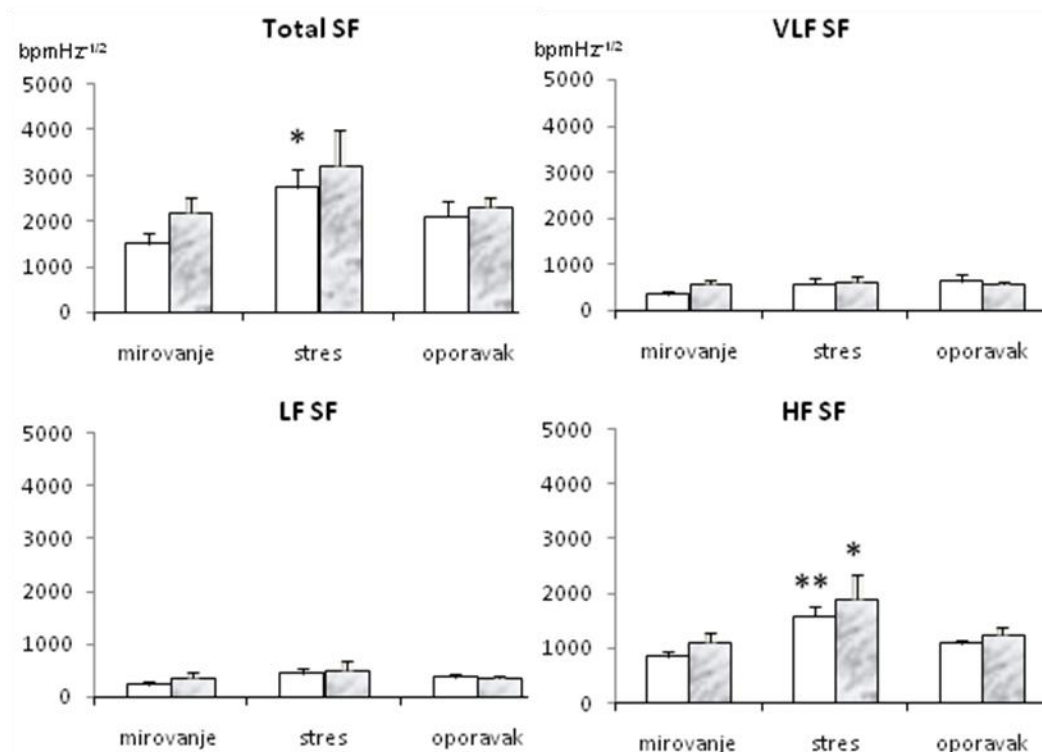
**Grafikon 11. Efekti stresa imobilizacijom na komponente dijastolnog arterijskog pritiska u prisustvu selektivnog antagonista vazopresinskih  $V_2$  receptora (500ng; i.c.v.)**

Antagonist  $V_2$  vazopresinskih receptora nije imao uticaja na efekte stresa imobilizacijom.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići, u dezinu mermera, predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog  $V_2$  receptora. DAP: dijastolni arterijski pritisak; Total DAP: ukupni varijabilitet; VLF DAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF DAP: varijabilitet visokih frekvencija. \*  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja

Na grafikonu 12 stres imobilizacijom izazvao je porast ukupne sume svih oscilacija srčane frekvence (Total SF), oscilacija niskih frekvenci (LF SF) i oscilacija visokih frekvenci srčane frekvence (HF SF), dok na oscilacije veoma niskih frekvenci (VLF SAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora u dozi od 500ng (i.c.v.) sprečio je porast ukupne sume svih oscilacija srčane frekvence (Total SF) izazvan stresom imobilizacijom, dok na ostale efekte stresa nije imao uticaja (grafikon 12).





**Grafikon 12. Efekti stresa imobilizacijom na komponente srčane frekvencije u prisustvu antagoniste vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (500ng; i.c.v.)**

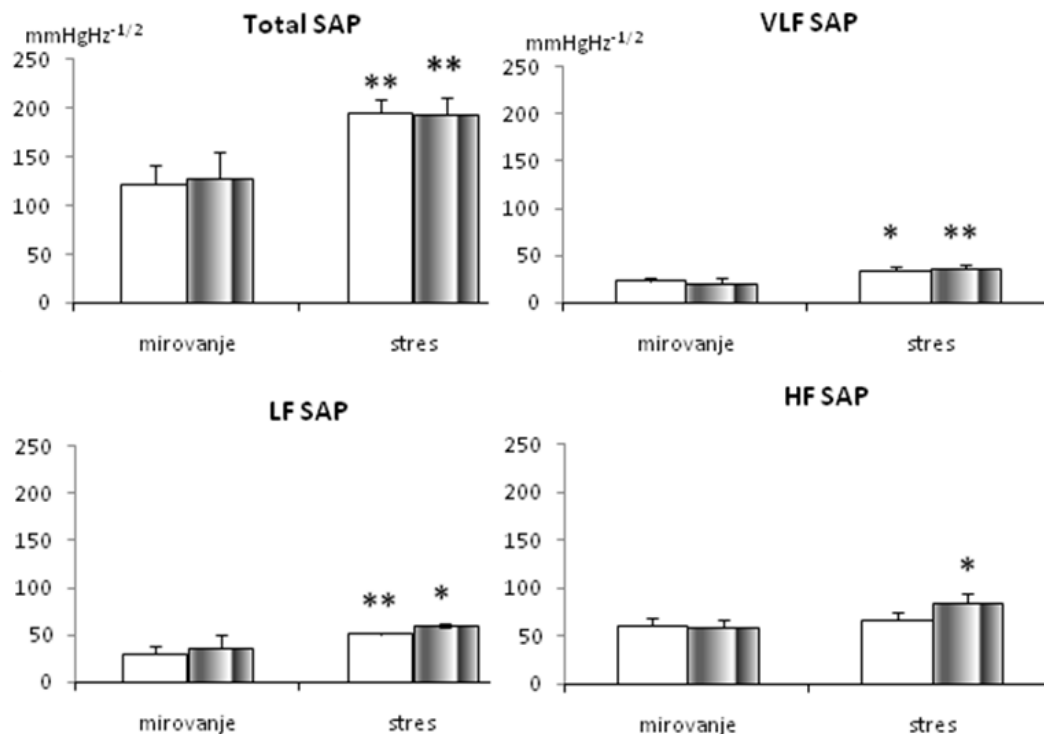
Blokada vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora sprečila je porast sume svih oscilacija srčane frekvencije (Total SF) nastao stresom imobilizacijom.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5μl fiziološkog rastvora); sivo obojeni stubići, u dezeniu mermera, predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. SF: srčana frekvencija; Total SF: ukupni varijabilitet; VLF SF: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SF: varijabilitet niskih frekvencija; HF SF: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; \*\* p < 0,01 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

#### **6.4 Efekti blokade vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na kardiovaskularni sistem u stanju stresa mlazom vazduha pod pritiskom**

Rezultati dobijeni nakon izlaganja stresu mlazom vazduha pacova kod kojih su blokirani vazopresinski V<sub>2</sub> receptori prikazani su na grafikonima 13 - 18.

Na grafikonu 13 stres mlazom vazduha izazvao je porast ukupne sume oscilacija sistolnog arterijskog pritiska (Total SAP), oscilacija veoma niskih frekvenci (VLF SAP) i oscilacija niskih frekvenci sistolnog arterijskog pritiska (LF SAP), dok na oscilacije visokih frekvenci (HF SAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) nije imao uticaja na varijabilitet sistolnog arterijskog pritiska u stanju mirovanja, ali je potencirao porast oscilacija visokih frekvencija SAP (HF SAP;  $p < 0,05$ ), dok na efekte stresa na ostale zone sistolnog arterijskog pritiska nije imao uticaja (grafikon 13).



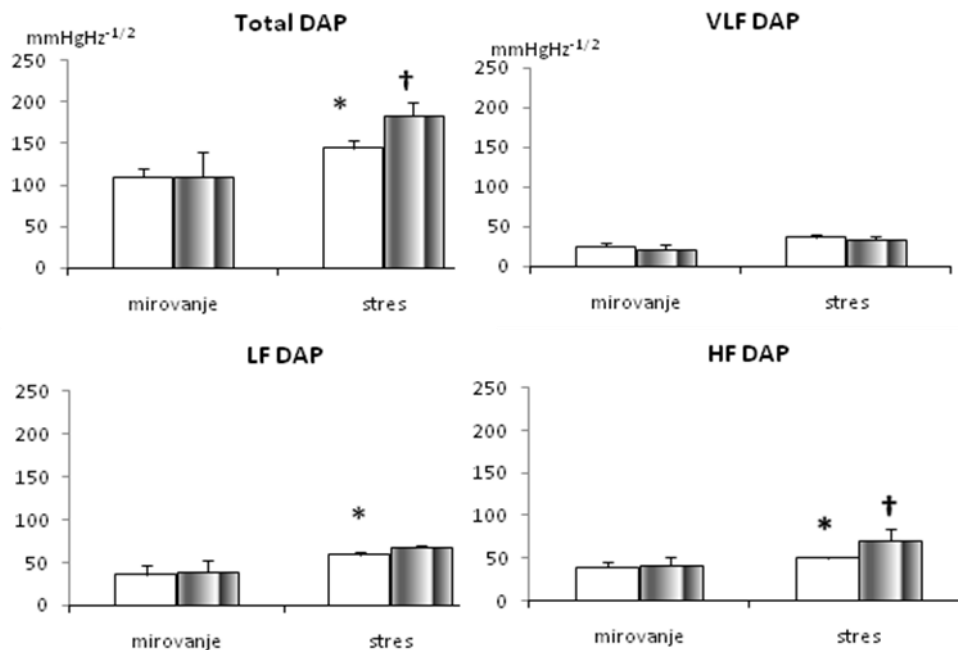
**Grafikon 13. Efekti stresa mlazom vazduha na komponente sistolnog arterijskog pritiska pri blokadi centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora potencirao je porast HF SAP u toku stresa mlazom vazduha.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (5μl 0,9% NaCl; i.c.v.); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

Na grafikonu 14 stres mlazom vazduha izazvao je porast ukupne sume oscilacija dijastolnog arterijskog pritiska (Total DAP), oscilacija niskih frekvenci (LF DAP) i oscilacija visokih frekvenci dijastolnog arterijskog pritiska (HF DAP), dok na oscilacije veoma niskih frekvenci (VLF DAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) nije imao uticaja na varijabilitet sistolnog arterijskog pritiska u stanju mirovanja, ali je sprečio porast Total DAP, LF DAP i HF DAP izazvane stresom mlazom vazduha, dok na oscilacije

veoma niskih frekvenci dijastolnog arterijskog pritiska nije imao uticaja (VLF DAP) (grafikon 13).

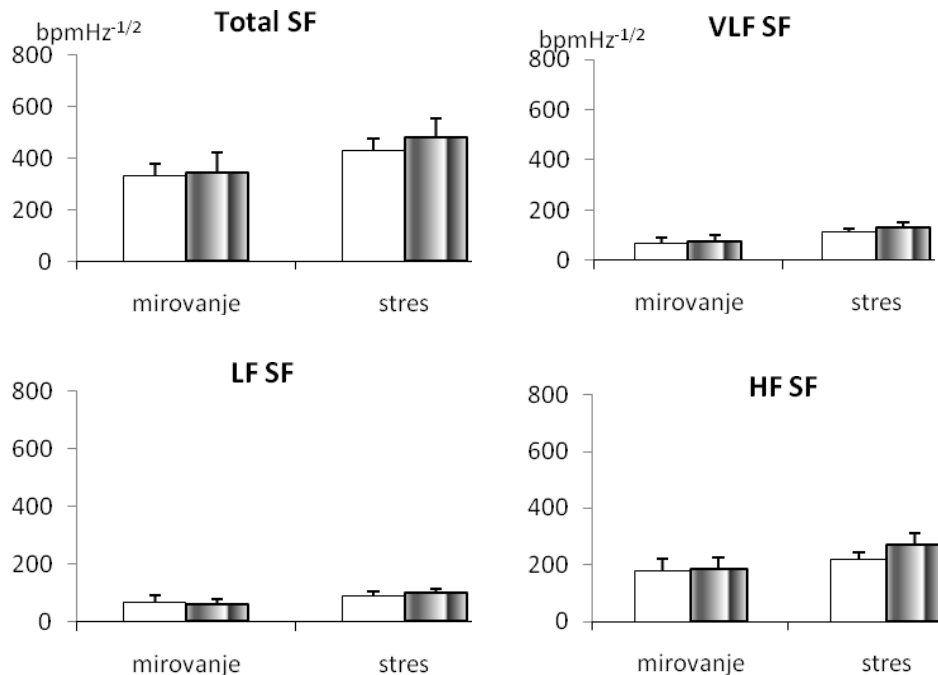


**Grafikon 14. Efekti stresa mlazom vazduha na komponente dijastolnog arterijskog pritiska pri blokadi centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Antagonist V<sub>2</sub> vazopresinskih receptora sprečio je porast Total DAP, LF DAP i HF DAP koje izaziva stres.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (5µl 0,9% NaCl; i.c.v.); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora DAP: dijastolni arterijski pritisak; Total DAP: ukupni varijabilitet; VLF DAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF DAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF DAP: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; † p < 0,05 u odnosu na pacove koji su imali *air jet* stres bez tretiranja lekom.

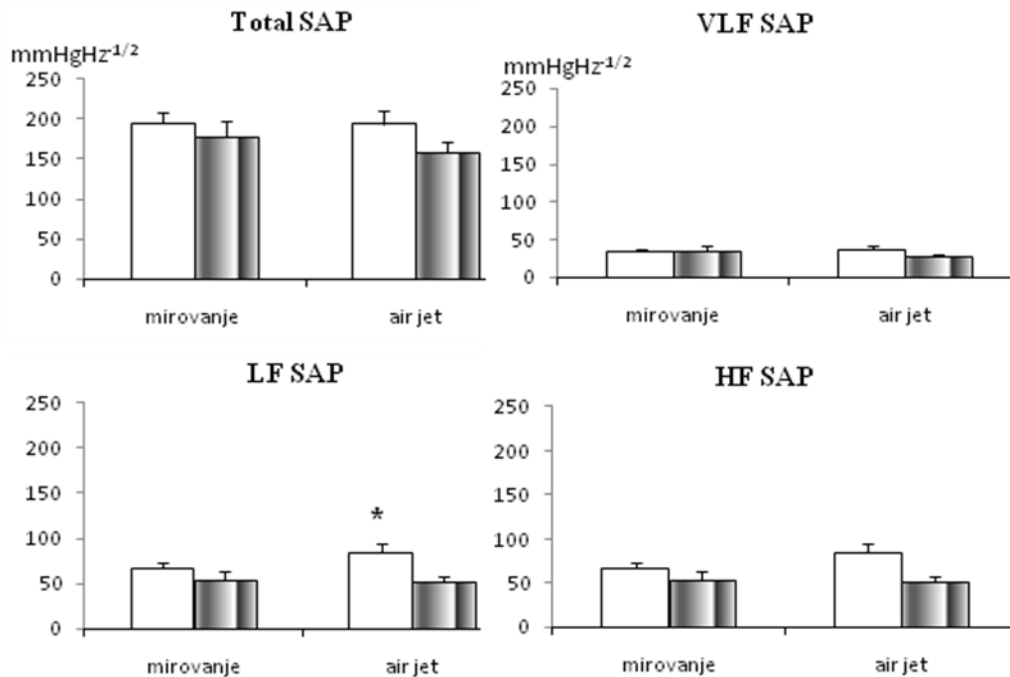
Na grafikonu 15 stres mlazom vazduha nije izazvao promene varijabiliteta srčane frekvence kod pacova. Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 100ng (i.c.v.) takođe nije imao uticaja na varijabilitet srčane frekvence u stanju mirovanja, a ni u stresu mlazom vazduha (grafikon 15).



**Grafikon 15. Efekti stresa mlazom vazduha na komponente srčane frekvencije pri blokadi centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (100ng; i.c.v.)**

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (5μl 0,9% NaCl; i.c.v.); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora SF: srčana frekvencija; Total SF: ukupni varijabilitet; VLF SF: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF DAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SF: varijabilitet visokih frekvencija.

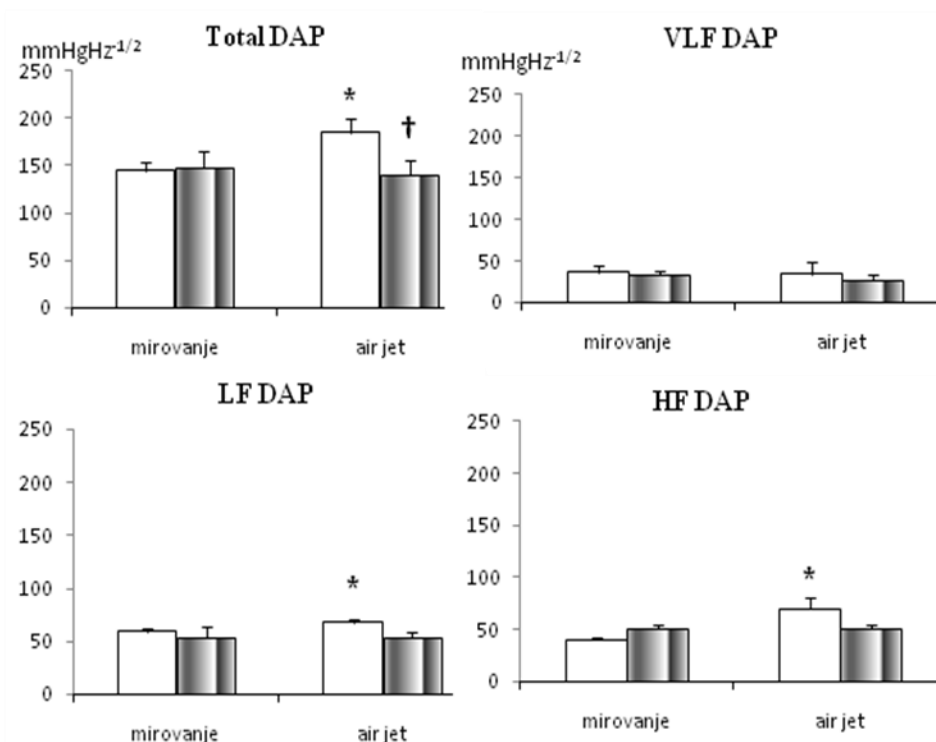
Na grafikonu 16 stres mlazom vazduha izazvao je samo porast oscilacija niske frekvencije (LF SAP), dok na oscilacije veoma niskih (VLF SAP) i visokih frekvenci sistolnog arterijskog pritiska (HF SAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 500ng (i.c.v.) sprečio je efekat stresa na LF SAP, dok na ostale zone sistolnog arterijskog pritiska nije imao uticaja (grafikon 16).



**Grafikon 16. Efekti stresa mlazom vazduha na komponente sistolnog arterijskog pritiska nakon blokade centralnih vazopresinskih  $V_2$  receptora (500ng; i.c.v.)**

Blokada vazopresinskih  $V_2$  receptora sprečila je porast LF SAP nastao stresom mlazom vazduha. Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (5 $\mu$ l 0,9% NaCl; i.c.v.); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagonistu vazopresinskog  $V_2$  receptora. SAP: sistolni arterijski pritisak; Total SAP: ukupni varijabilitet; VLF SAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF SAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SAP: varijabilitet visokih frekvencija. \*  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja.

Na grafikonu 17 stres mlazom vazduha izazvao je porast ukupne sume oscilacija (Total DAP), oscilacija niskih (LF DAP) i visokih frekvenci dijastolnog arterijskog pritiska (HF DAP), dok na oscilacije veoma niskih frekvenci (VLF DAP) nije imao uticaja. Antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora (500ng; i.c.v.) sprečio je efekte stresa mlazom vazduha na varijabilitet dijastolnog arterijskog pritiska (grafikon 17).

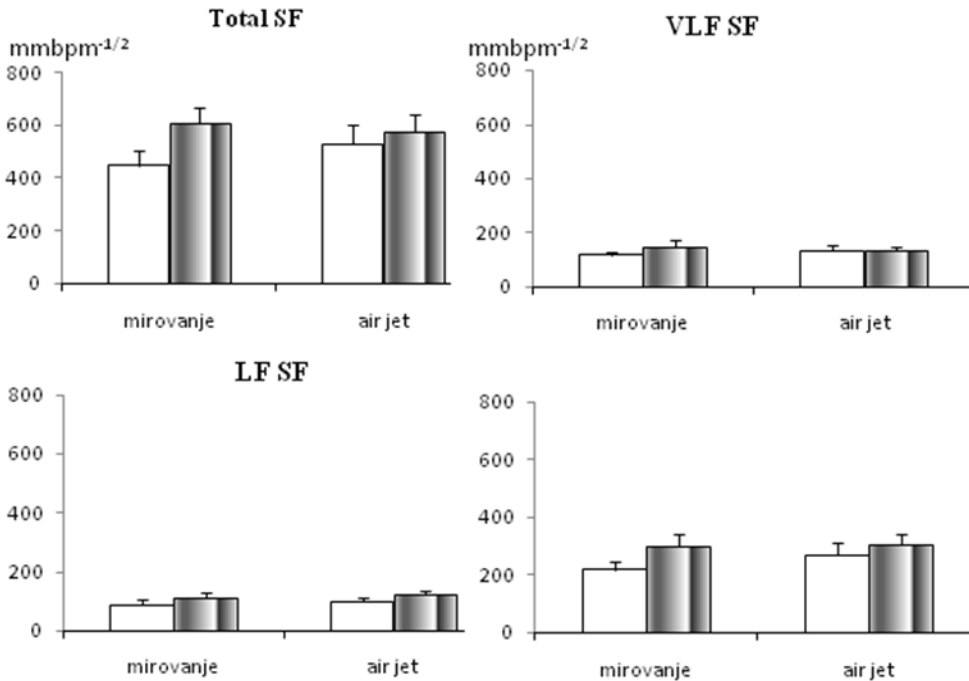


**Grafikon 17. Efekti stresa mlazom vazduha na komponente dijastolnog arterijskog pritiska pri blokadi centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (500ng; i.c.v.)**

Blokada vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora sprečila je porast vrednosti Total DAP, LF DAP i HF DAP izazvanih stresom mlazom vazduha.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (5μl 0,9% NaCl; i.c.v.); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. DAP: dijastolni arterijski pritisak; Total DAP: ukupni varijabilitet; VLF DAP: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF DAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF DAP: varijabilitet visokih frekvencija. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja; † p < 0,05 u odnosu na pacove koji su imali *air jet* stres bez tretiranja lekom.

Na grafikonu 18 stres mlazom vazduha nije imao efekte na varijabilitet srčane frekvence, kao ni intracerebroventrikularno ubrizgan antagonist vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u dozi od 500ng (grafikon 18).



**Grafikon 18. Efekti stresa mlazom vazduha na komponente srčane frekvencije nakon blokade centralnih vazopresinskih  $V_2$  receptora (500ng; i.c.v.)**

Blokada vazopresinskih  $V_2$  receptora nije izazvala promene varijabiliteta SF u stanju mirovanja, a ni u toku oporavka od stresa mlazom vazduha.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog  $V_2$  receptora SF: srčana frekvencija; Total SF: ukupni varijabilitet; VLF SF: varijabilitet veoma niskih frekvencija; LF DAP: varijabilitet niskih frekvencija; HF SF: varijabilitet visokih frekvencija.

Na grafikonu 19 intracerebroventrikularno ubrizgavanje antagonista vazopresinskih  $V_2$  receptora u obe doze (100ng i 500ng) nije imalo uticaja na vrednosti inteziteta sistolnog arterijskog pritiska u stanju mirovanja. Stres mlazom vazduha izazvao je porast inteziteta odgovora sistolnog arterijskog pritiska koji su obe doze antagonista vazopresinskih  $V_2$  receptora sprečile.

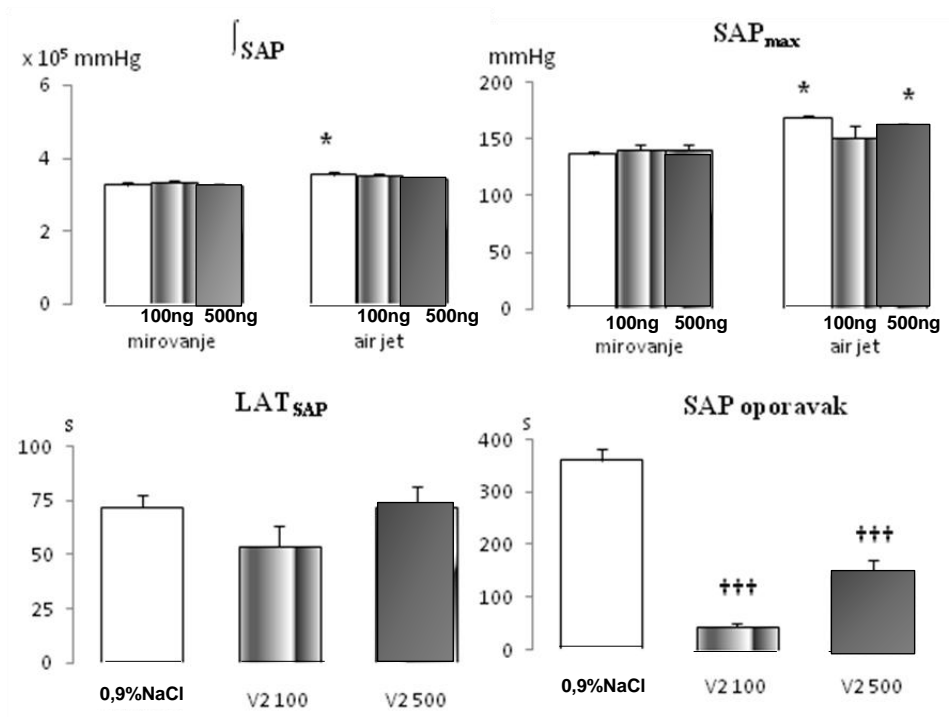
Ubrizgavanje antagonista  $V_2$  vazopresinskih receptora, u obe doze (100ng i 500ng), u stanju mirovanja, nije statistički značajno uticalo na promenu maksimalne vrednosti sistolnog krvnog pritiska ( $SAP_{max}$ ). U periodu oporavka od stresa mlazom vazduha pretretiranje



antagonistom  $V_2$  receptora u dozi od 100ng sprečilo je porast SAP nakon izlaganja mlazu vazduha u odnosu na netretirane pacove, dok doza od 500ng antagonista nije imala uticaja.

Vreme potrebno za postizanje maksimalnog odgovora sistolnog krvnog pritiska ( $LAT_{SAP}$ ) u periodu oporavka od stresa mlazom vazduha nakon pretretiranja antagonistom  $V_2$  receptora, u obe doze, nije bilo statistički značajno različito u odnosu na netretirane pacove izložene mlazu vazduha.

Na grafikonu 19 vidimo da je i period oporavka (SAP oporavak) tj. period povratka vrednosti sistolnog krvnog pritiska na bazalne vrednosti (vrednosti u stanju mirovanja), nakon izlaganja stresu, pacova pretretiranih antagonistom  $V_2$  receptora u dozi od 100ng ( $p < 0,001$ ), odnosno 500 ng i.c.v. ( $p < 0,001$ ), bio statistički značajno kraći u odnosu na netretirane pacove.



**Grafikon 19. Efekti stresa mlazom vazduha na parametre sistolnog arterijskog pritiska pri blokadi centralnih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora**

Stres je značajno povećao vrednosti  $\int_{SAP}$  i  $SAP_{max}$ . V<sub>2</sub> antagonista u obe doze inhibirao je porast  $\int_{SAP}$  i skratio oporavak dok je samo u dozi od 100ng smanjio porast  $SAP_{max}$ .

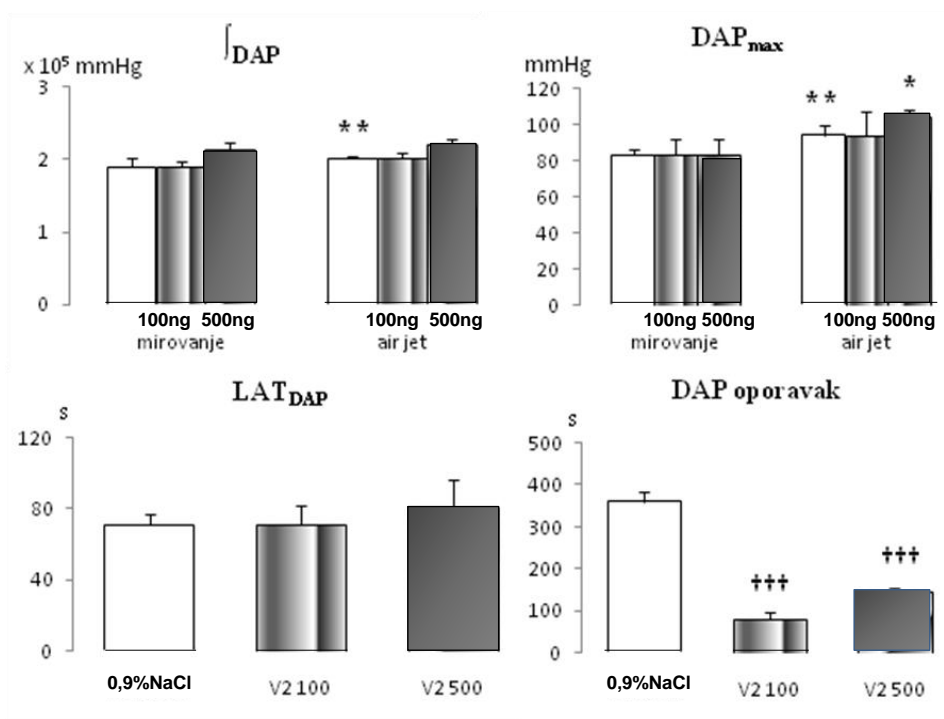
Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (5μl 0,9% NaCl; i.c.v.); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora; tamno sivo obojeni stubići predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog V<sub>2</sub> receptora. SAP: sistolni arterijski pritisak;  $\int_{SAP}$  intezitet odgovora sistolnog arterijskog pritiska;  $SAP_{max}$  je maksimalni porast sistolnog arterijskog pritiska; LAT<sub>SAP</sub> predstavlja latentni period; SAP oporavak je period potreban za povratak sistolnog arterijskog pritiska na bazalnu vrednost. \* p < 0,05 u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, ††† p < 0,001 u odnosu na pacove koji su imali *air jet* stres bez tretiranja lekom (nebojeni stubići).

Na grafikonu 20 vidimo da u u mirovanju nije došlo do statistički značajne promene inteziteta odgovora dijastolnog krvnog pritiska ( $\int_{DAP}$ ) nakon intracerebroventrikularnog ubrizgavanja antagoniste V<sub>2</sub> receptora, dok je pretretiranje antagonistom V<sub>2</sub> receptora sprečilo porast inteziteta odgovora dijastolnog krvnog pritiska nastalo izlaganjem pacova mlazu vazduha.

Primena antagoniste  $V_2$  vazopresinskih receptora (100ng i 500ng; i.c.v.) nije imala uticaja na maksimalni porast dijastolnog krvnog pritiska ( $DAP_{max}$ ) u stanju mirovanja. No, kod izlaganja pacova mlazu vazduha doza od 100 ng sprečila je porast dijastolnog krvnog pritiska, za razliku od doze od 500ng.

Vreme potrebno za postizanje maksimalnog odgovora dijastolnog krvnog pritiska ( $LAT_{DAP}$ ) usled izlaganja stresu mlazom vazduha, a nakon pretretiranja pacova antagonistom  $V_2$  receptora (100ng i 500ng; i.c.v.), nije bilo statistički značajno promenjeno u odnosu na netretirane pacove izložene mlazu vazduha.

Period oporavka tj. period povratka vrednosti dijastolnog krvnog pritiska na bazalne vrednosti (DAP oporavak) nakon prestanka stresa mlazom vazduha kod pacova pretretiranih antagonistom  $V_2$  receptora sa 100 ng i 500 ng (i.c.v.) bio je statistički značajno skraćen u odnosu na netretirane pacove ( $p < 0,001$ ).



### Grafikon 20. Efekti stresa mlazom vazduha na parametre dijastolnog arterijskog pritiska pri blokadi centralnih vazopresinskih $V_2$ receptora

Antagonist  $V_2$  receptora vazopresina je u obe doze sprečio porast  $\int_{DAP}$ , u dozi od 100ng  $DAP_{max}$  nastao u stresu i u obe doze je skratio oporavak posle stresa.

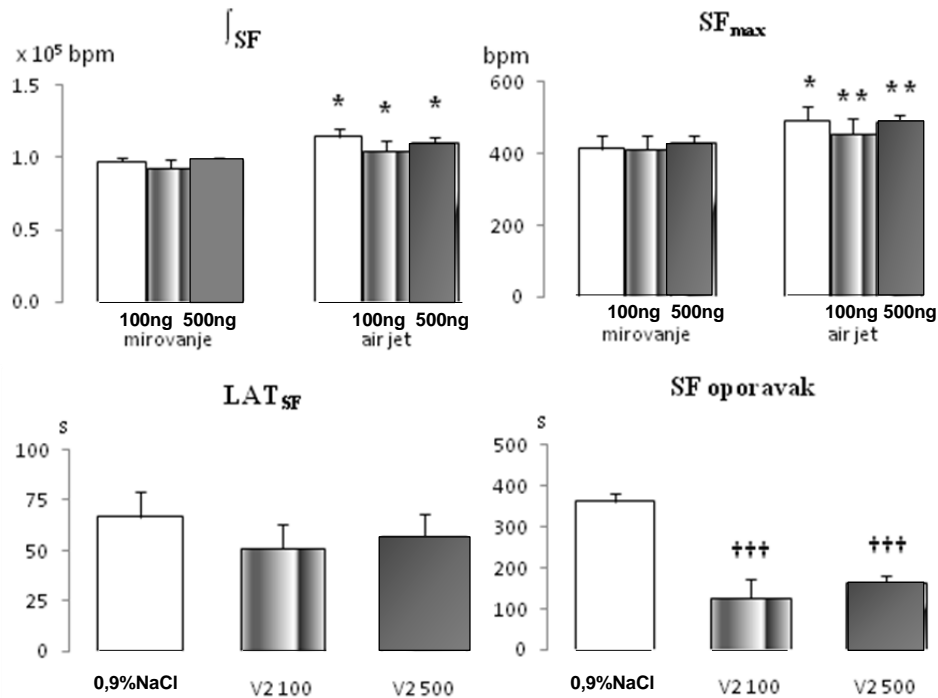
Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog  $V_2$  receptora; tamno sivo obojeni stubići predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog  $V_2$  receptora  $DAP$ : dijastolni arterijski pritisak;  $\int_{DAP}$  intezitet odgovora sistolnog arterijskog pritiska;  $DAP_{max}$  je maksimalni porast dijastolnog arterijskog pritiska;  $LAT_{DAP}$  predstavlja latentni period;  $DAP$  oporavak je period potreban za povratak dijastolnog arterijskog pritiska na bazalnu vrednost. \*  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, +++  $p < 0,001$  u odnosu na pacove koji su imali *air jet* stres bez tretiranja lekom (neobojeni stubići).

Na grafikonu 21 bazalna vrednost inteziteta odgovora srčane frekvencije ( $\int_{SF}$ ) nije bila statistički značajno promenjena posle aplikacije 100ng i 500ng antagonista  $V_2$  receptora vazopresina. Nakon izlaganja stresu mlazom vazduha došlo je do statistički značajnog porasta inteziteta odgovora srčane frekvencije koje pretretiranje pacova antagonistom  $V_2$  receptora nije sprečilo.

Primena antagonista  $V_2$  receptora, i.c.v., nije izazvala promenu bazalne vrednosti srčane frekvencije ( $SF_{max}$ ). U periodu oporavka od stresa mlazom vazduha pretretiranje antagonistom  $V_2$  vazopresinskih receptora nije uticalo na statistički značajan porast srčane frekvencije tokom izlaganja pacova stresu mlazom vazduha u odnosu na netretirane pacove.

Vreme potrebno za postizanje maksimalne vrednosti srčane frekvencije ( $LAT_{SF}$ ) usled izlaganja stresu mlazom vazduha nakon blokade  $V_2$  vazopresinskih receptora sa 100ng i 500ng i.c.v. selektivnog antagonista nije bilo statistički značajno promenjeno u odnosu na netretirane pacove izložene mlazu vazduhom.

Period oporavka tj. period povratka vrednosti srčane frekvencije na bazalne vrednosti ( $SF$  oporavak) nakon završetka stresa mlazom vazduha kod pacova pretretiranih antagonistom  $V_2$  receptora (100ng i 500ng; i.c.v.) statistički značajno ( $p < 0,001$ ) bio je skraćen u odnosu na netretirane pacove.



**Grafikon 21. Efekti stresa mlazom vazduha na parametre srčane frekvencije pri blokadi centralnih vazopresinskih  $V_2$  receptora**

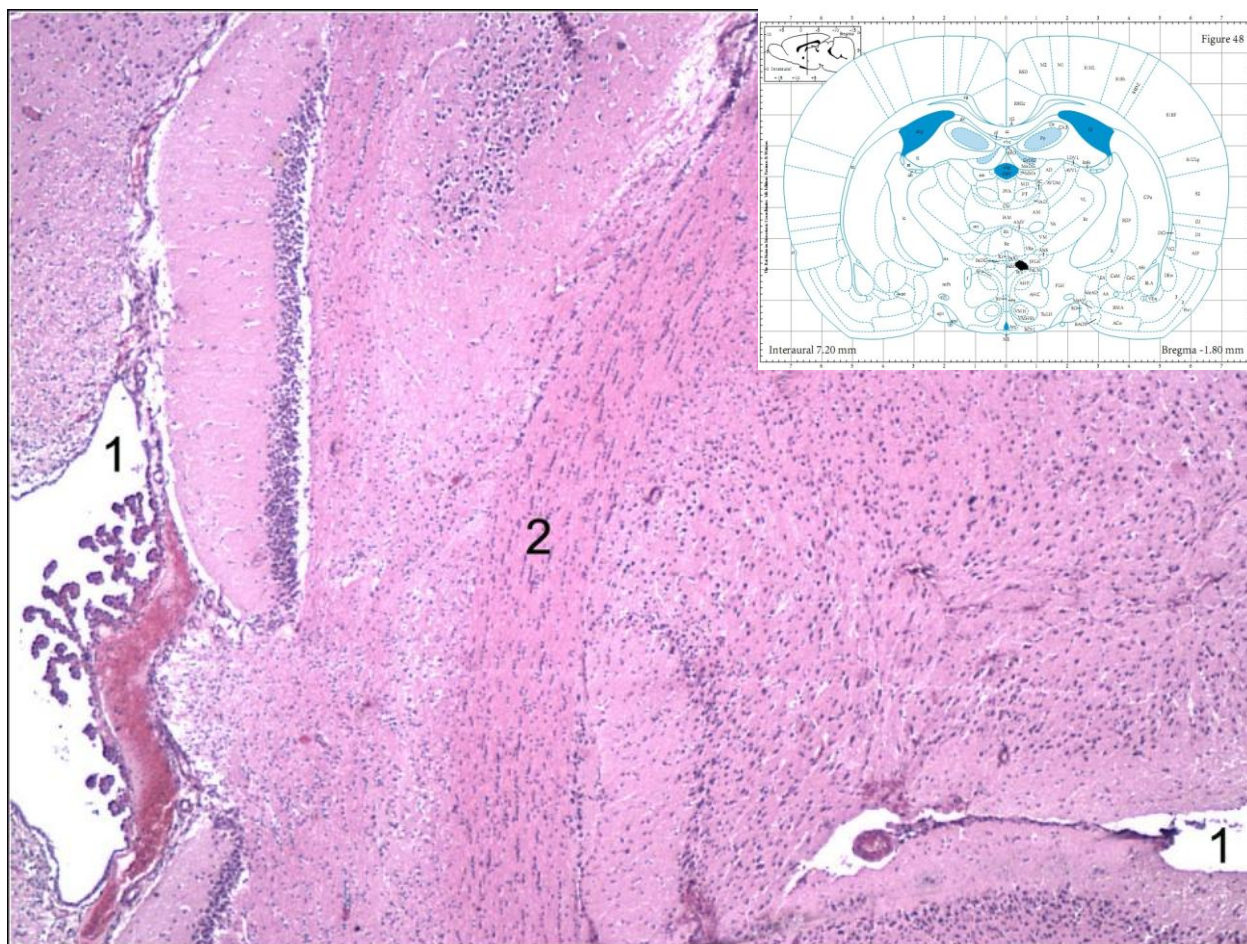
Antagonist  $V_2$  vazopresinskih receptora je u obe doze značajno smanjio period oporavka SF od stresa.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata  $\pm$  S.E.M. Neobojeni stubići predstavljaju kontrolne grupe (i.c.v. injekcije 5 $\mu$ l fiziološkog rastvora); vertikalno šrafirani stubići predstavljaju dozu od 100ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog  $V_2$  receptora; tamno sivo obojeni stubići predstavljaju dozu od 500ng i.c.v. datog antagoniste vazopresinskog  $V_2$  receptora SF: srčana frekvencija;  $\int SF$  intezitet odgovora srčane frekvencije;  $SF_{max}$  je maksimalni porast srčane frekvencije;  $LAT_{SF}$  predstavlja latentni period; SF oporavak je period potreban za povratak dijastolnog arterijskog pritiska na bazalnu vrednost. \*  $p < 0,05$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na odgovarajuću grupu u stanju mirovanja, †††  $p < 0,001$  u odnosu na pacove koji su imali *air jet* stres bez tretiranja lekom (neobojeni stubići).

### **5.5 Morfološka karakterizacija paraventrikularnog jedra**

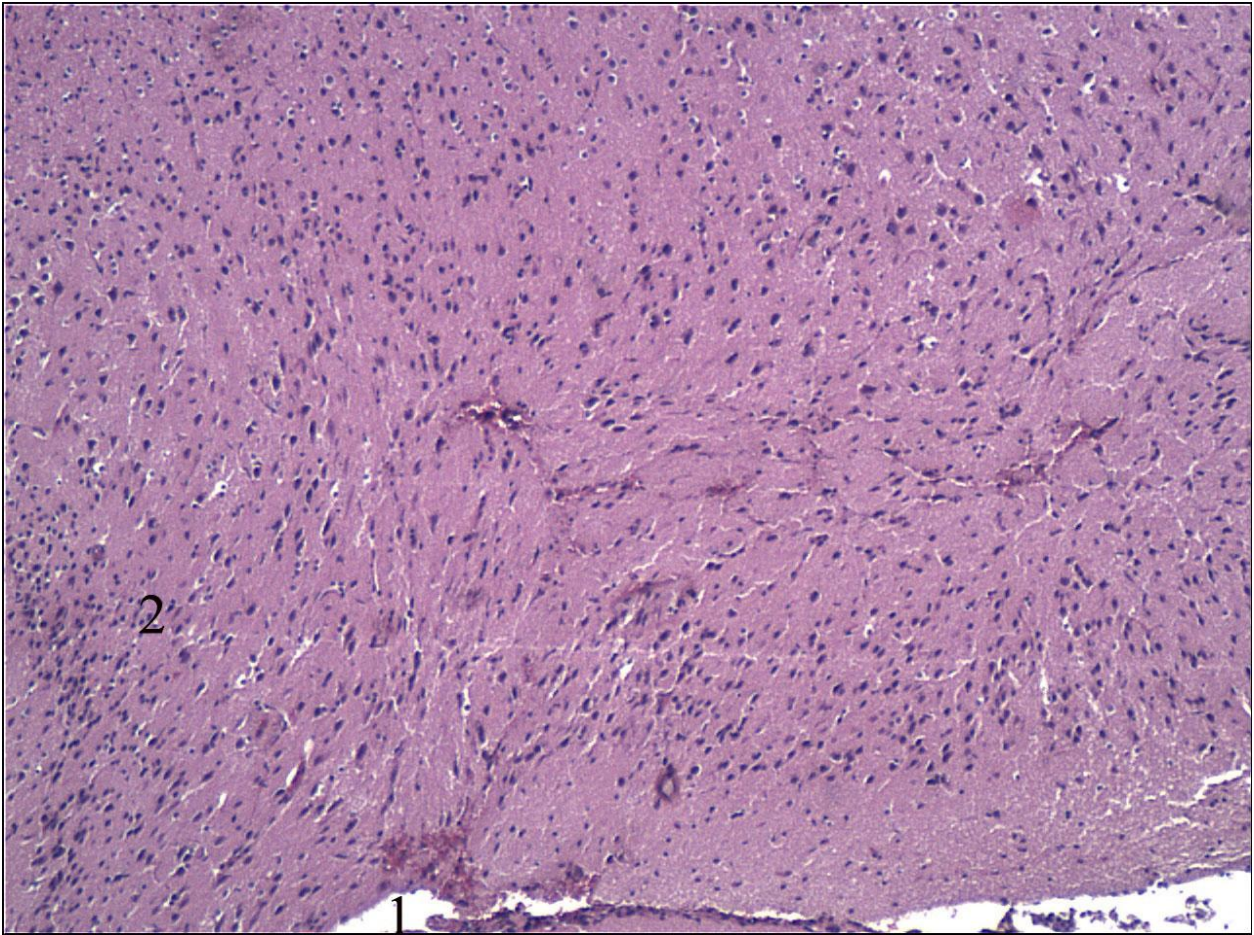
Na histološkim preparatima manjih uveličanja prikazan je horizontalni presek mozga gde se jasno identifikuje lateralna komora koja predstavlja središnju šupljinu velikog mozga smeštenu u središtu međumozga. Na horizontalnim preseccima se vidi slepoočni rog (*cornu temporale*) lateralne komore usmeren od središnjeg dela unapred i nadole, a slepo se završava iza *corpura*

*amygdaloideuma*. Iznad lateralnih komora prepoznajemo splet *corpus callosuma*, međuhemisferične komisure čija se vlakna spajaju u mediosagitalnoj ravni neposredno iznad treće moždane komore (Slika 10A, 10B, 10A, 10B).



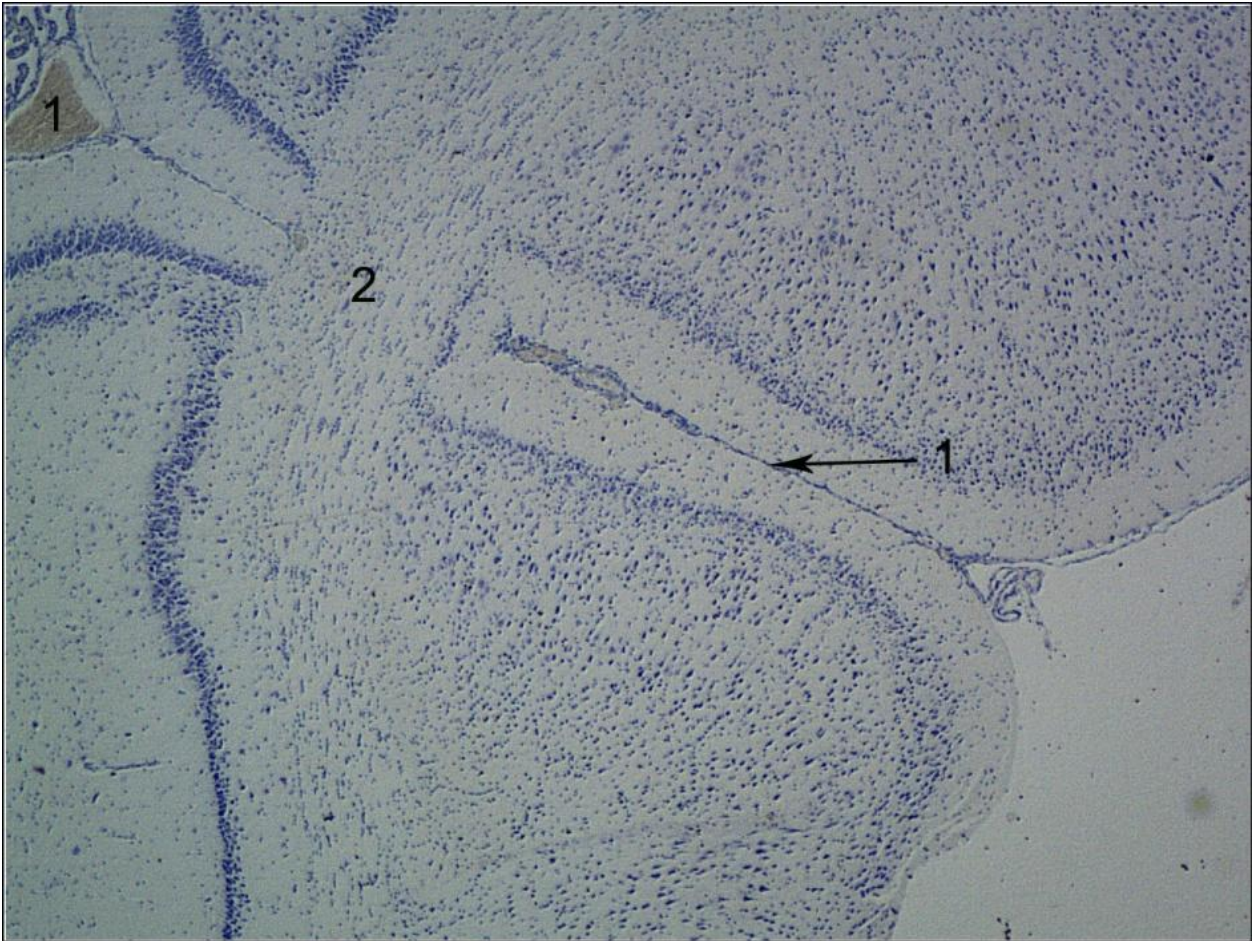
Slika 10A. HE, 20X, 1. treća moždana komora; 2. corpus callosum.

U gornjem desnom uglu nalazi se šematski prikaz horizontalnog preseka mozga na udaljenosti od 1,80 mm od bregme i 7,20 mm od kostiju lobanje. Plavo su prebojene lateralne i treća moždana komora, a crno je prebojeno paraventricularno jedro koje je lokalizovano uz treću moždanu komoru (160).

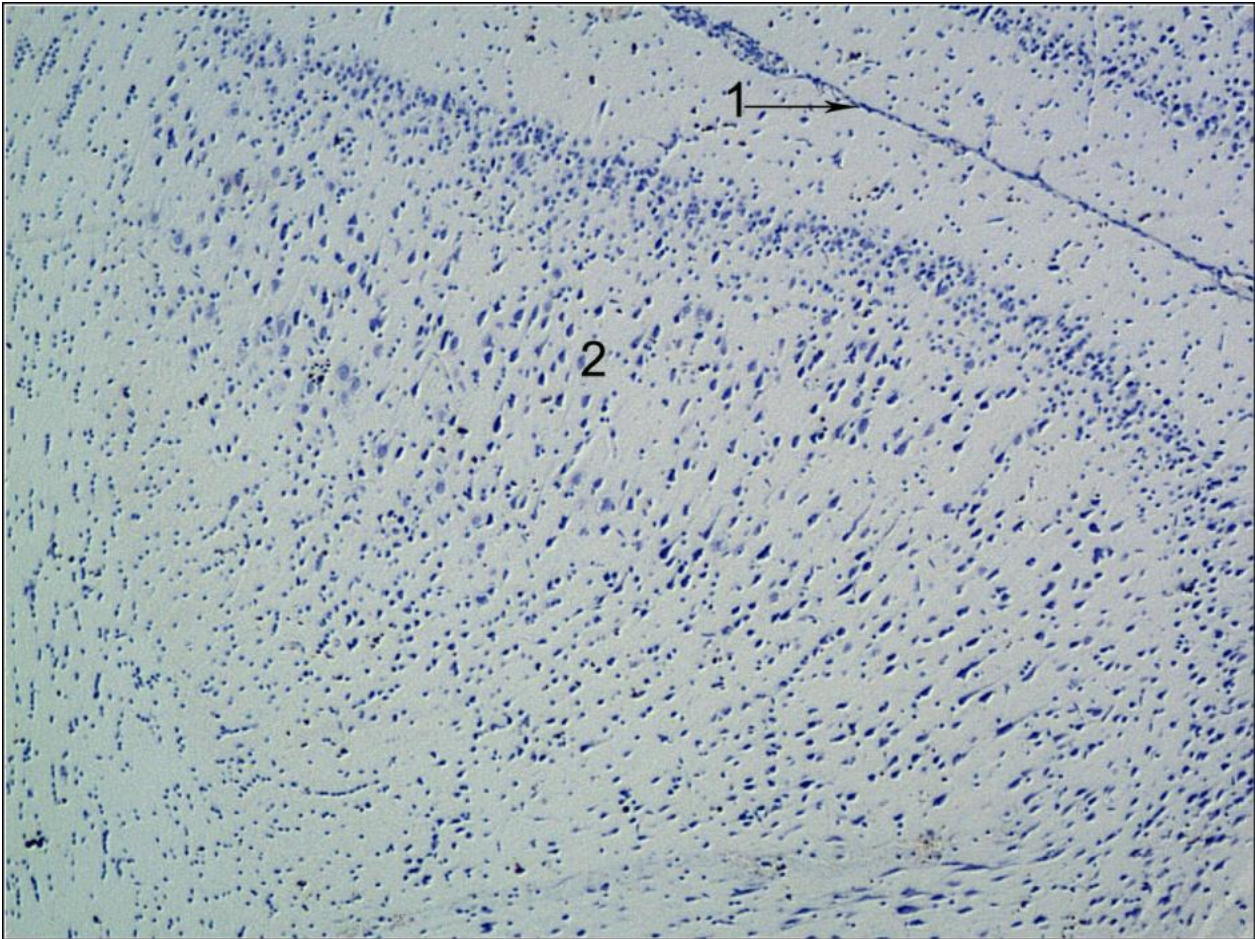


Slika 10B. HE, 40X, 1. treća moždana komora; 2. corpus callosum



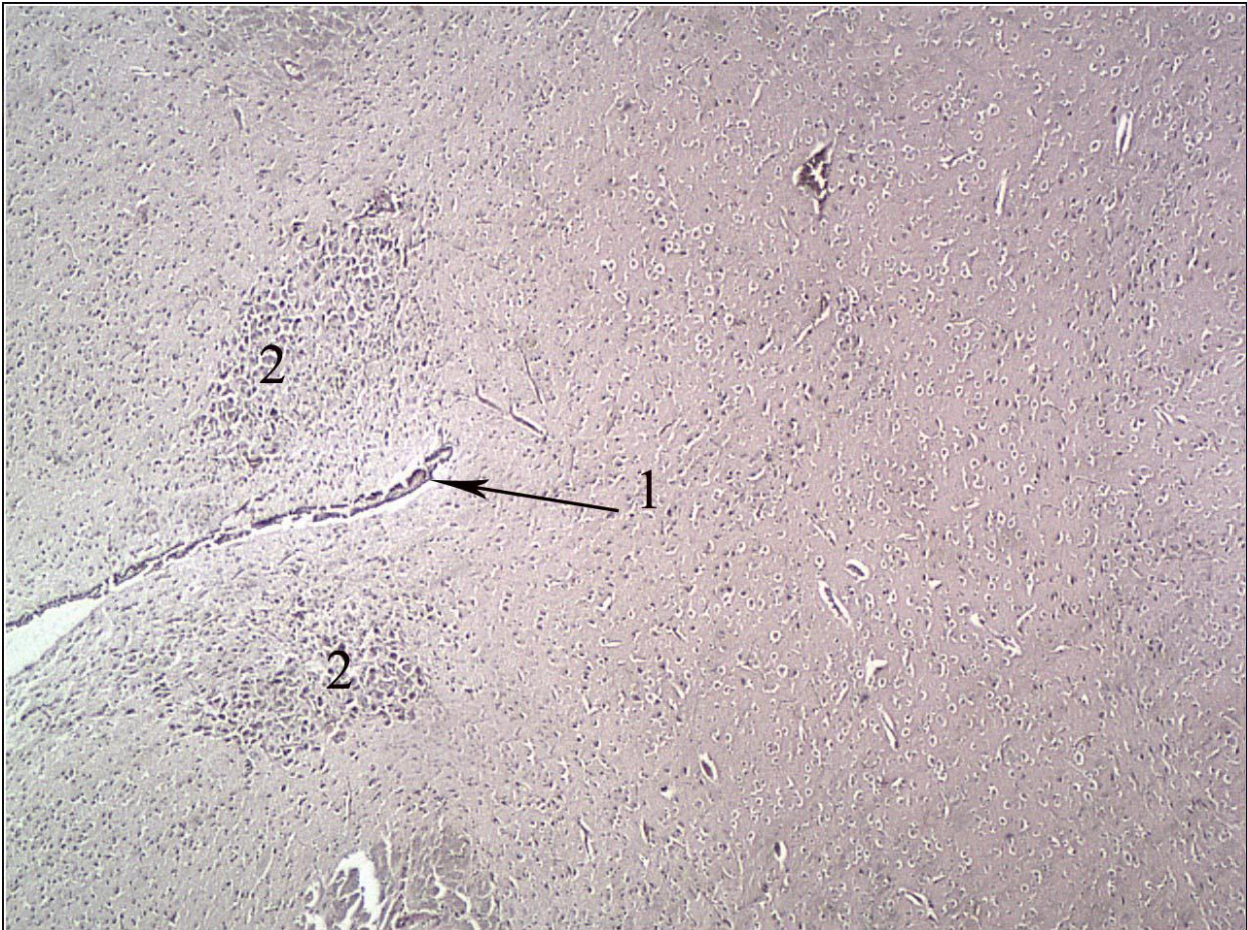


Slika 10A. Tionin , 20X. 1. treća moždana komora, 2. corpus callosum

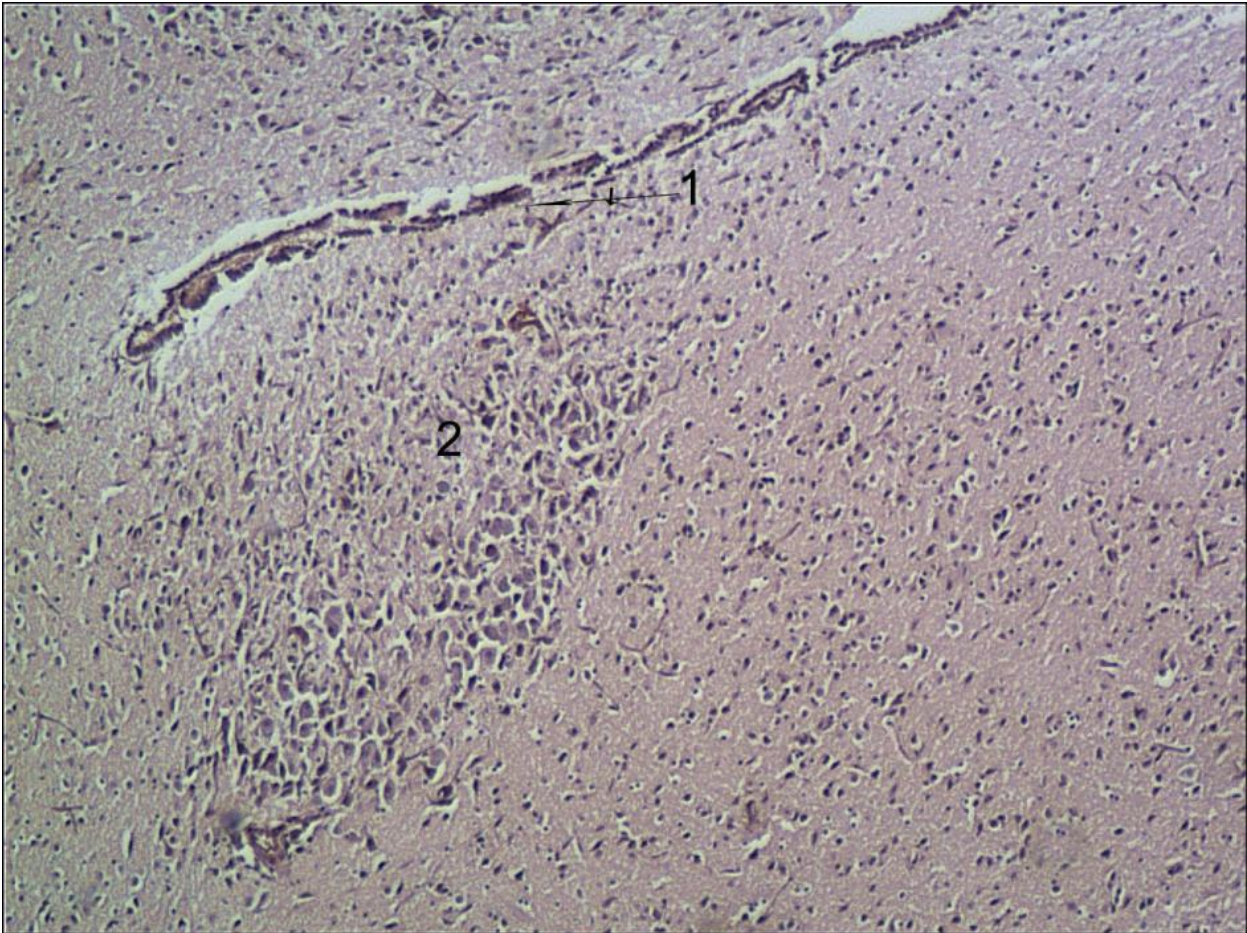


Slika 10B. Tionin 40x. 1. treća moždana komora, 2. magnocelularni neuroni

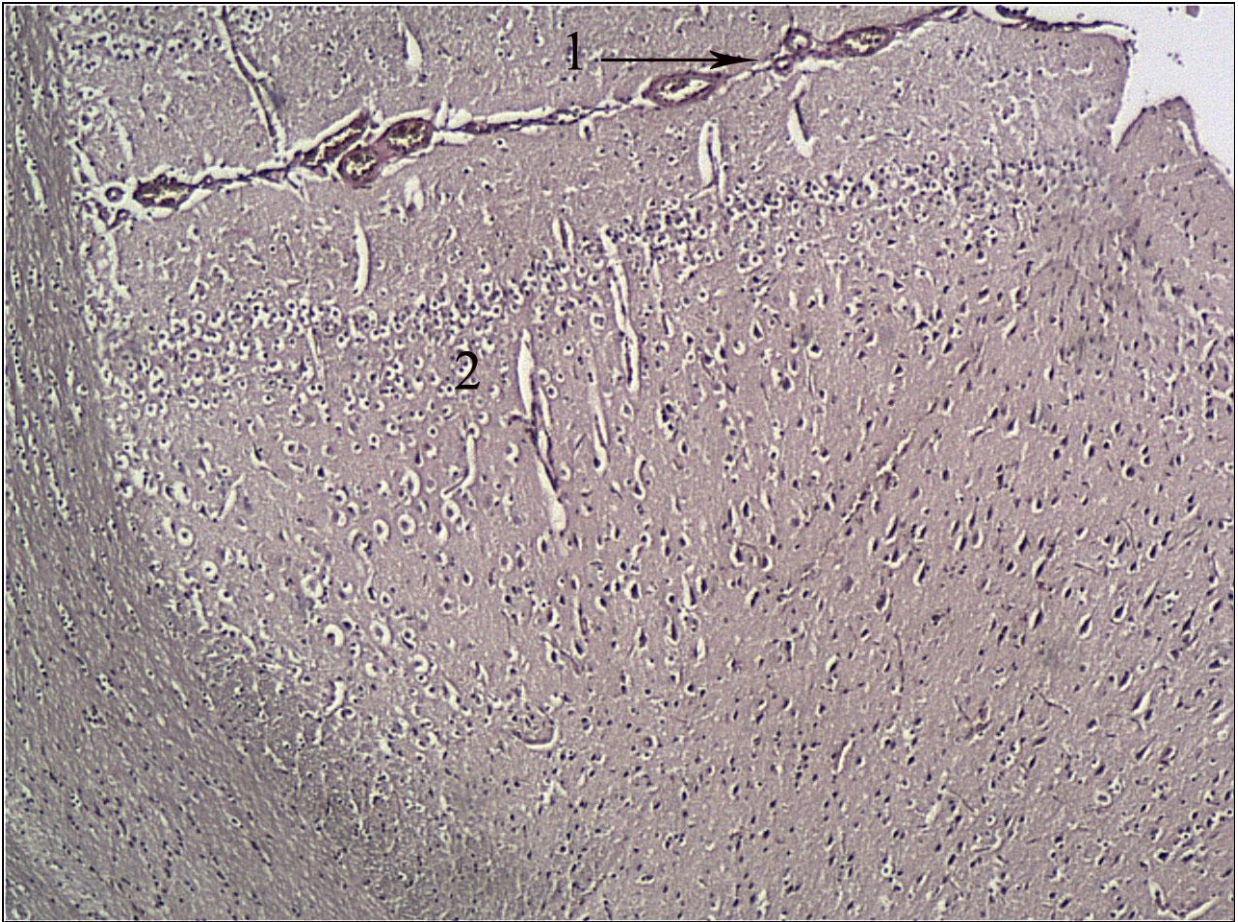
Na horizontalnim preseccima velikog mozga morfološki dominira deo treće moždane komore, koju predstavlja uska šupljina smeštena u središtu međumozga. Njene leve i desne bočne zidove u gornjem delu gradi unutrašnja, slobodna strana talamusa, a donji deo gradi unutrašnja strana hipotalamusa. Granicu između talamusa i hipotalamusa čini sulcus hypothalamicus. Pod treće komore čini hipotalamus (Slika 10A, 10B, 10C, 10A, 10B ).



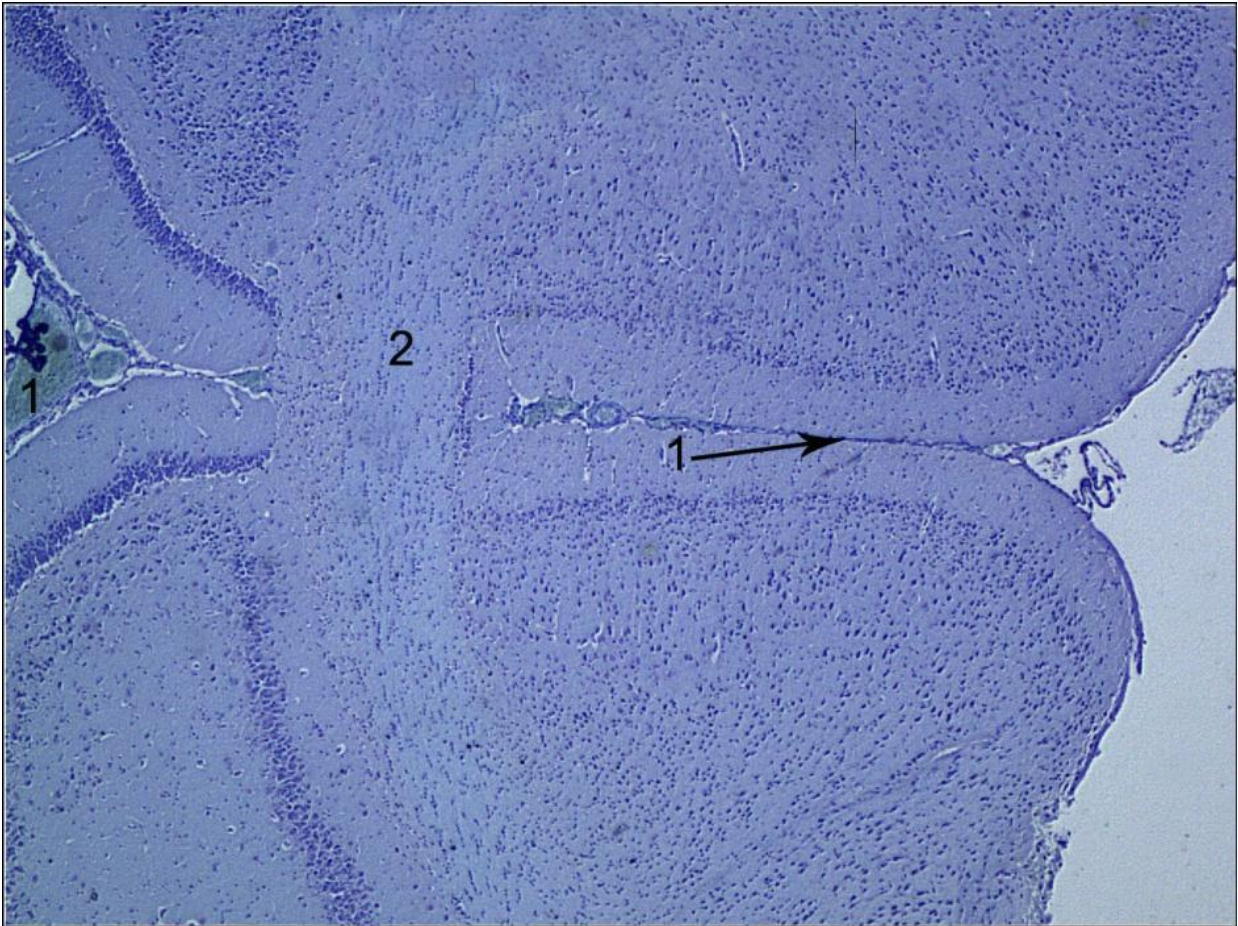
Slika 10A. Van Gieson. 20X, 1. treća moždana komora, 2. paraventrikularno jedro



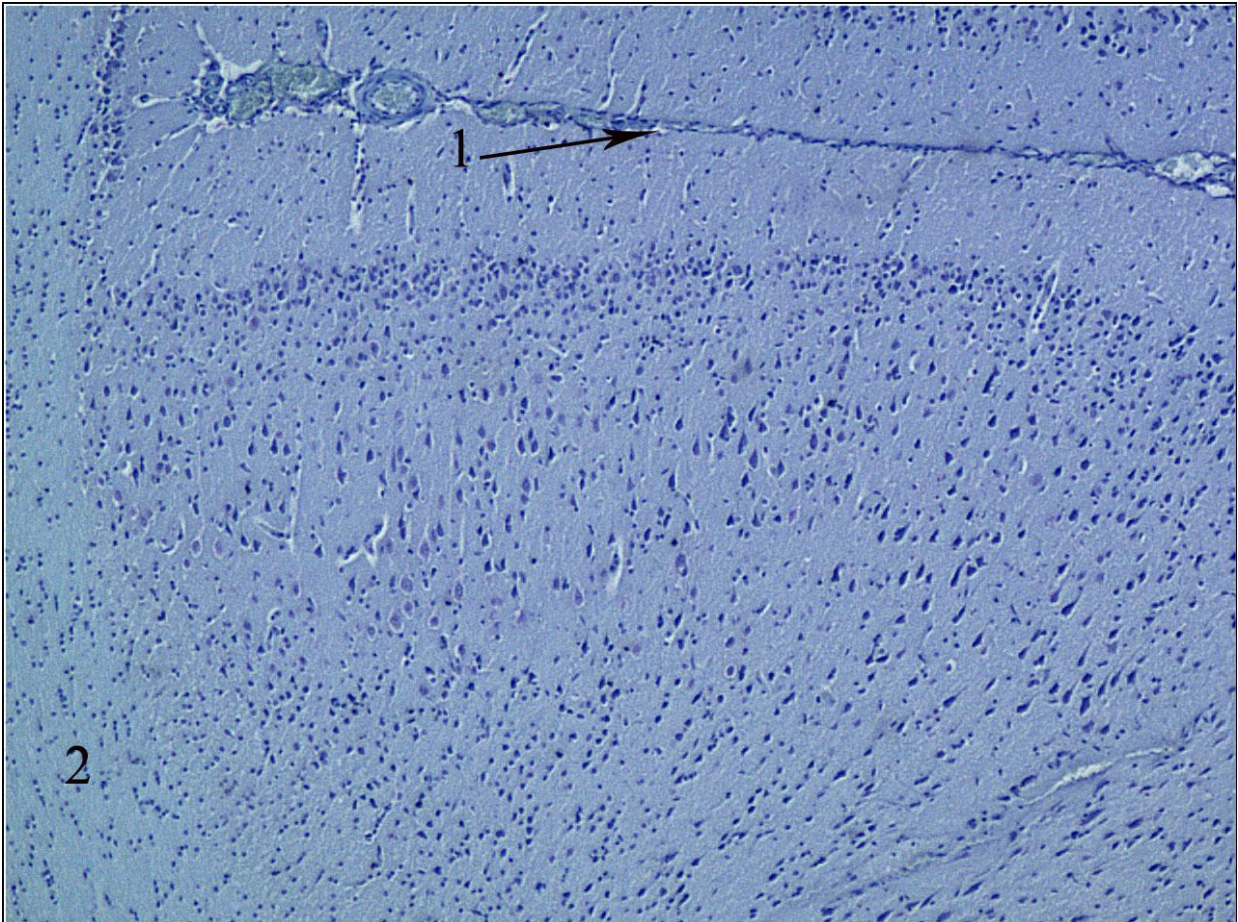
Slika 10B. Van Gieson.40X, 1. treća moždana komora, 2. paraventrikularno jedro



Slika 10C. Van Gieson, 40X, 1. treća moždana komora, 2. magnocelularni neuroni

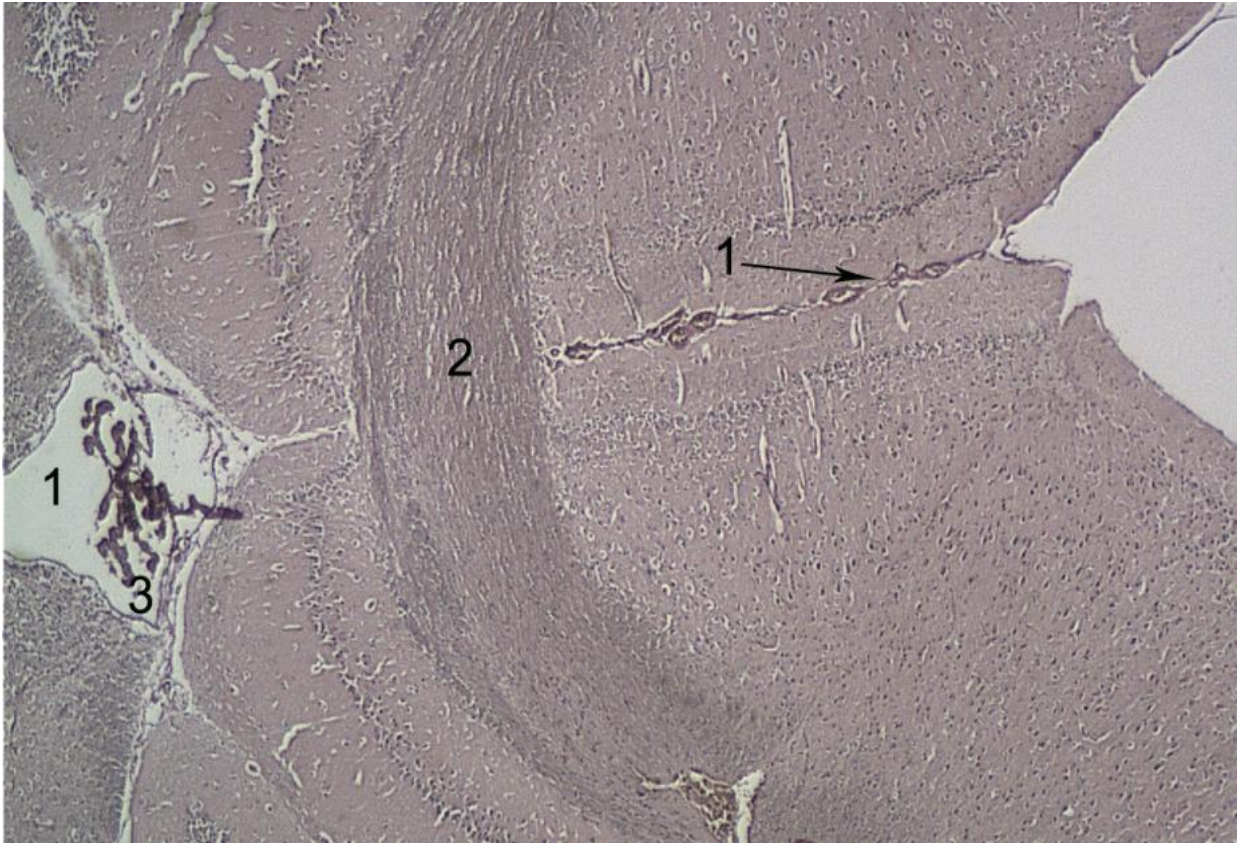


Slika 10A. Krezil fast violet , 20 x, 1. treća moždana komora, 2. corpus callosum



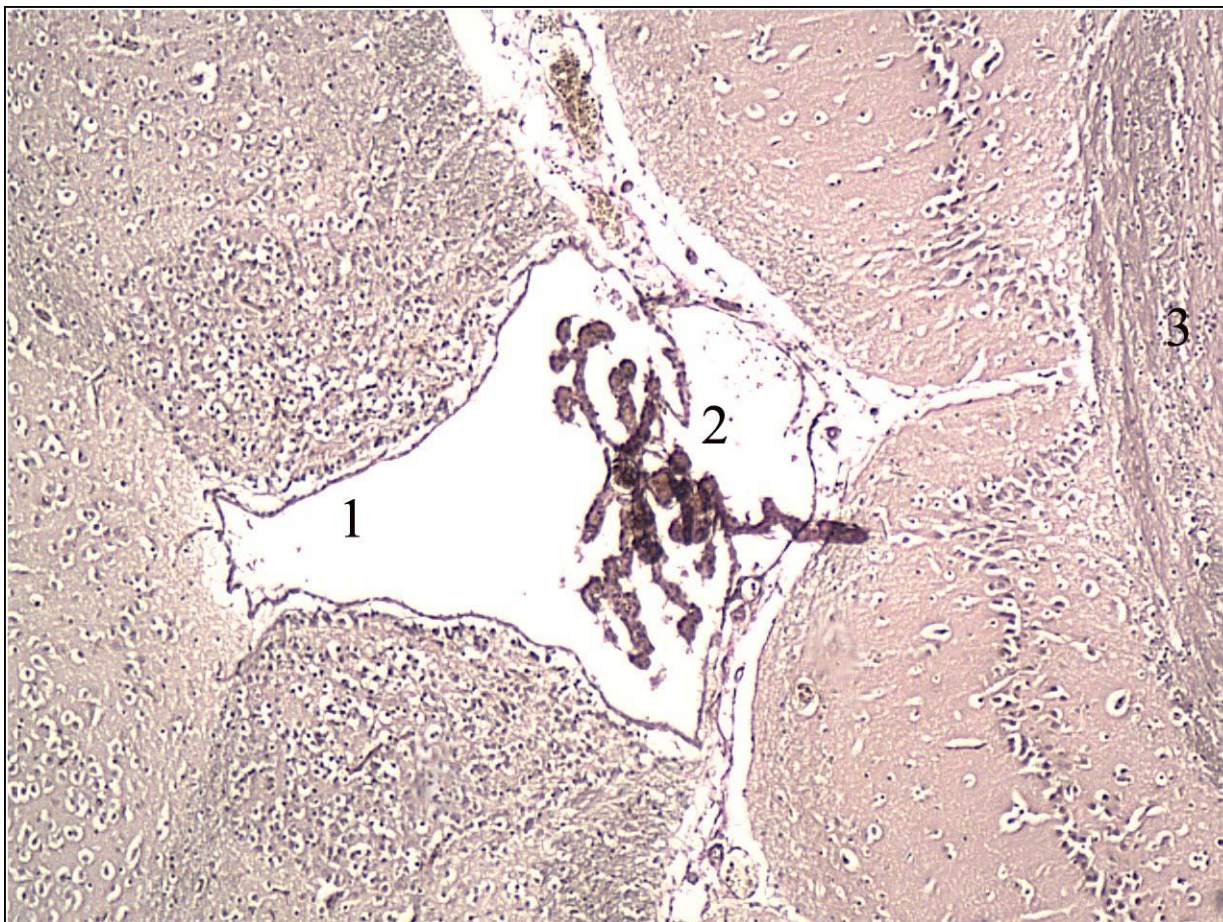
Slika 10B. Krezil fast violet, 40 x, 1. treća moždana komora, 2. corpus callosum

Na histološkim preparatima primećujemo i plexus choroideus (horoidni splet) treće komore. Horoidni splet (plexus choroideus) predstavlja parnu strukturu koja se sastoji iz resičastih produžetaka horiodnih ćelija koje stvaraju liquor cerebrospinalis (Slika 11).



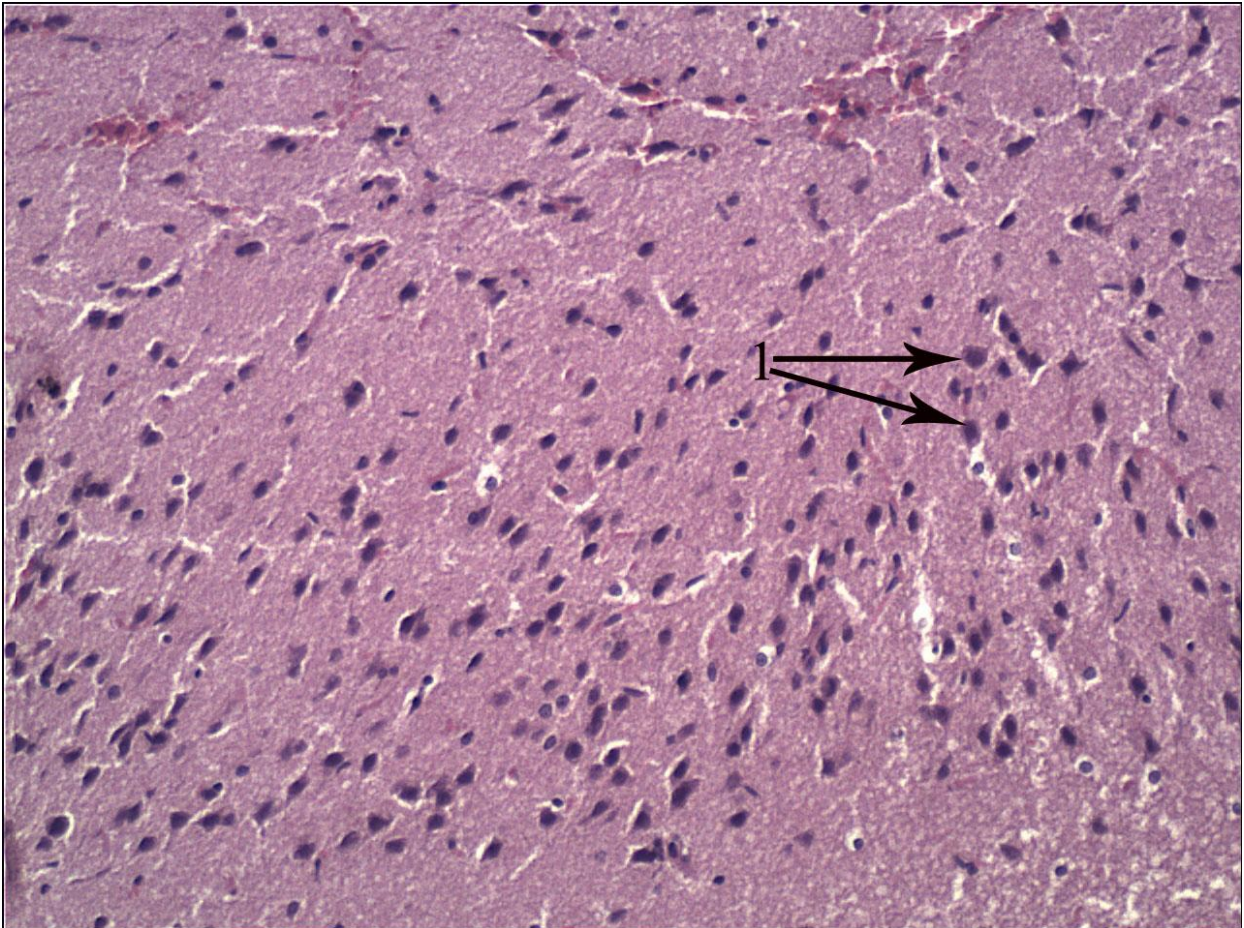
Slika 11A. Van Gieson, 20X. 1. treća moždana komora, 2. corpus callosum, 3. plexus choroideus



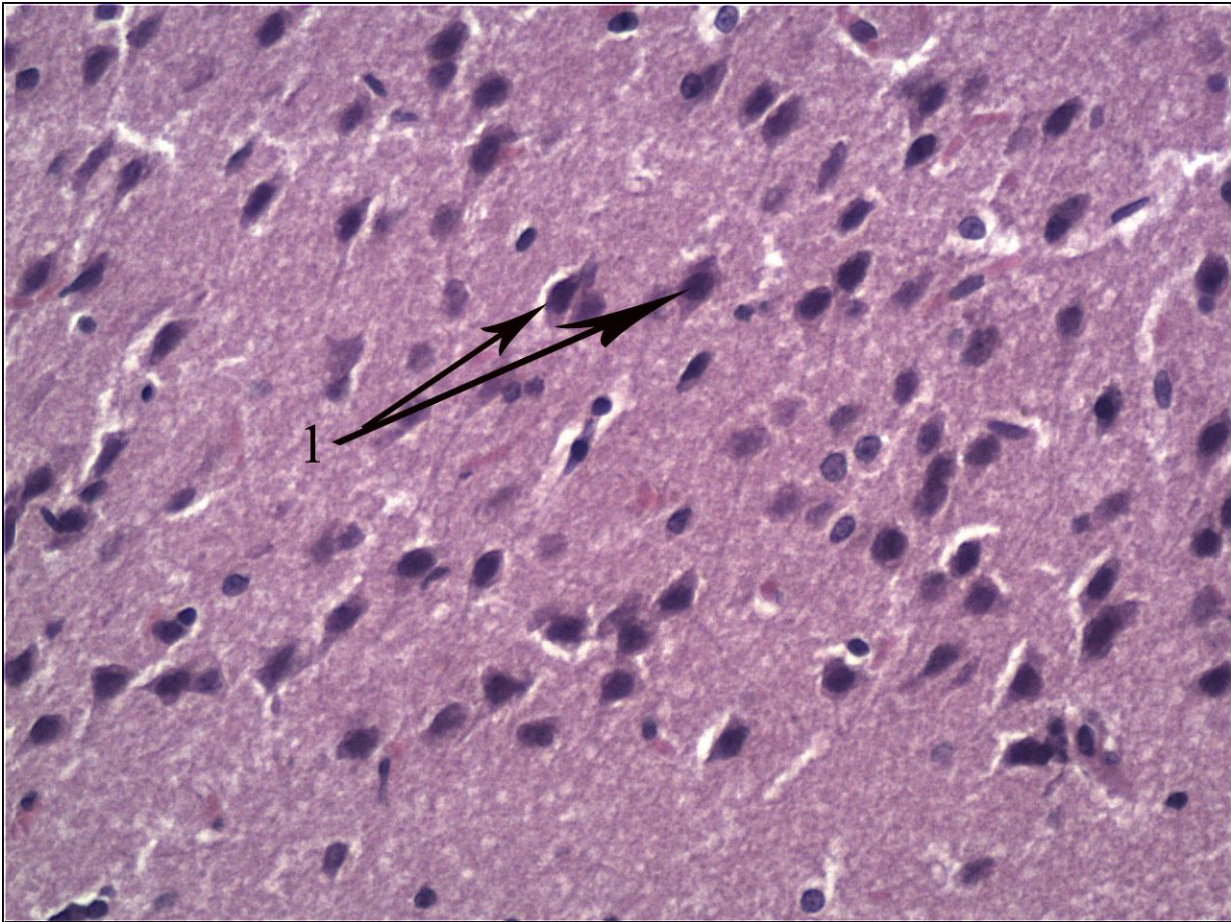


Slika 11B. Van Gieson, 40x, 1. treća moždana komora, 2. plexus choroideus, 3. corpus callosum

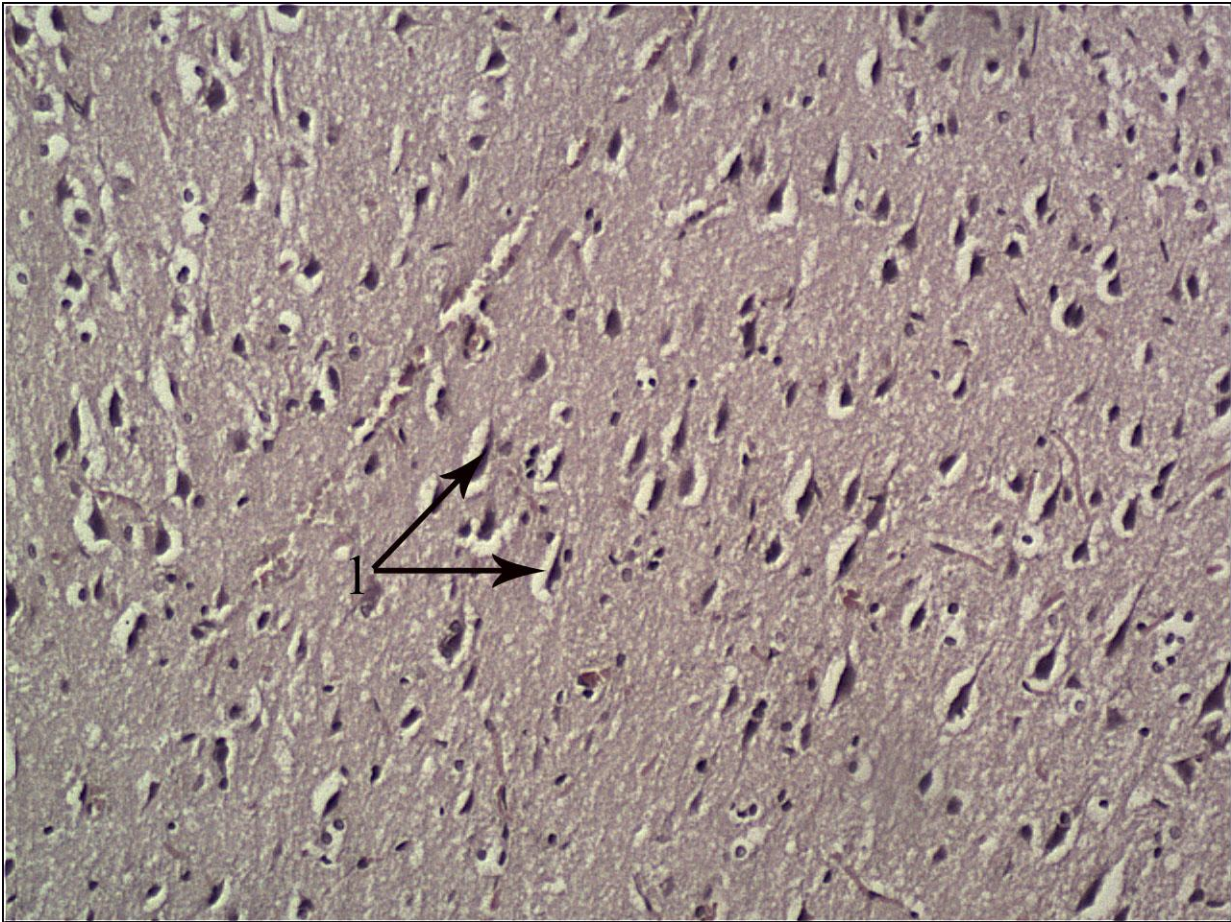
Na histološkim preparatima većeg uveličanja primećujemo magnocelularne neurone, neposredno uz treću komoru. Magnocelularne formacije čine supraoptička (nc. suprachiasmaticus, nc. supraopticus, nc. hypothalamicus anterior) i deo paraventricularnog jedra koji čine zajednički supraoptikohipofizni trakt. Neposredno ispod poda treće komore u obliku vertikalne ploče je smešteno paraventricularno jedro koje spada u grupu supraoptičkih jedara. Paraventricularno jedro sadrži mnogo magnocelularnih neurona jasno uočljivih na uveličanjima (slike 12A, 12B, 13A, 13B, 14A, 14B, 15A, 15B).



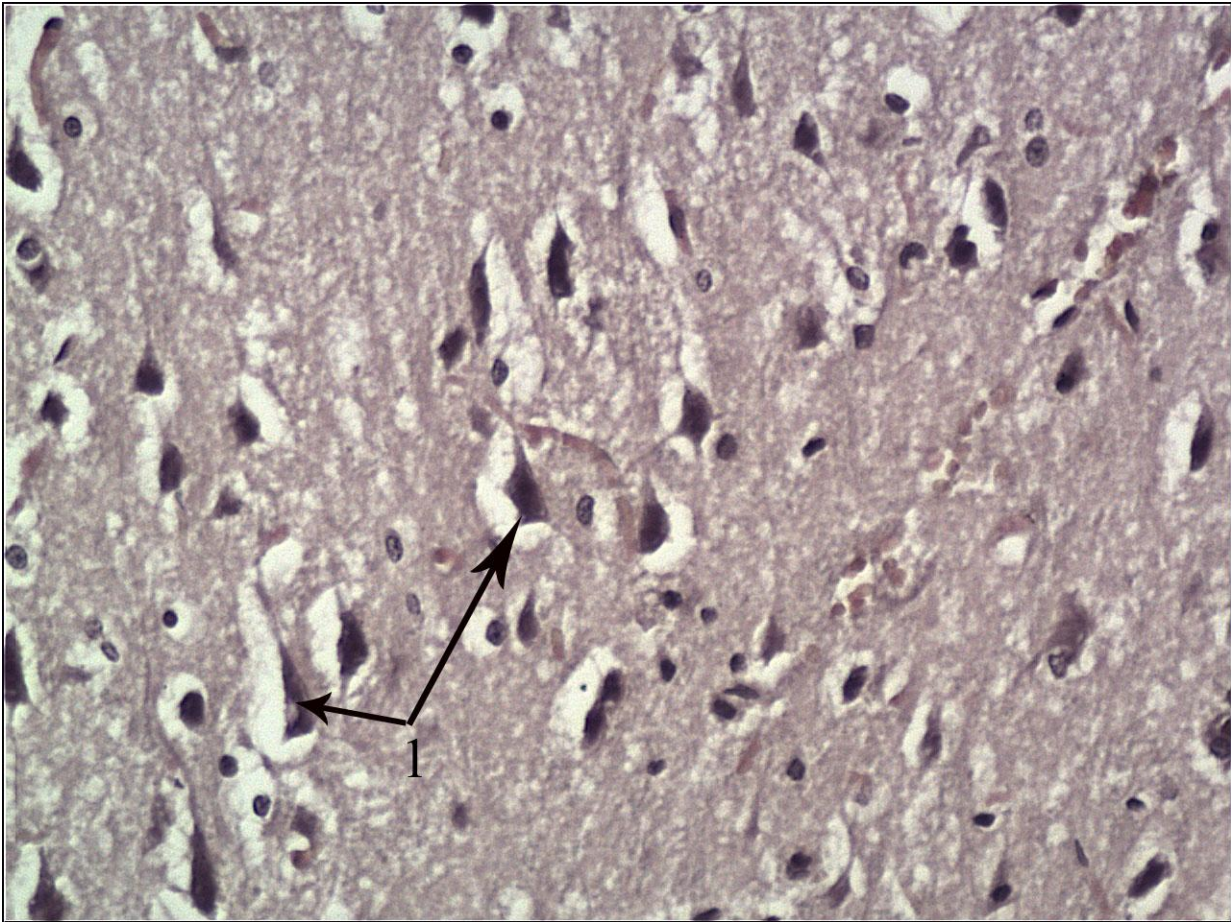
Slika 12A. HE, 100x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa



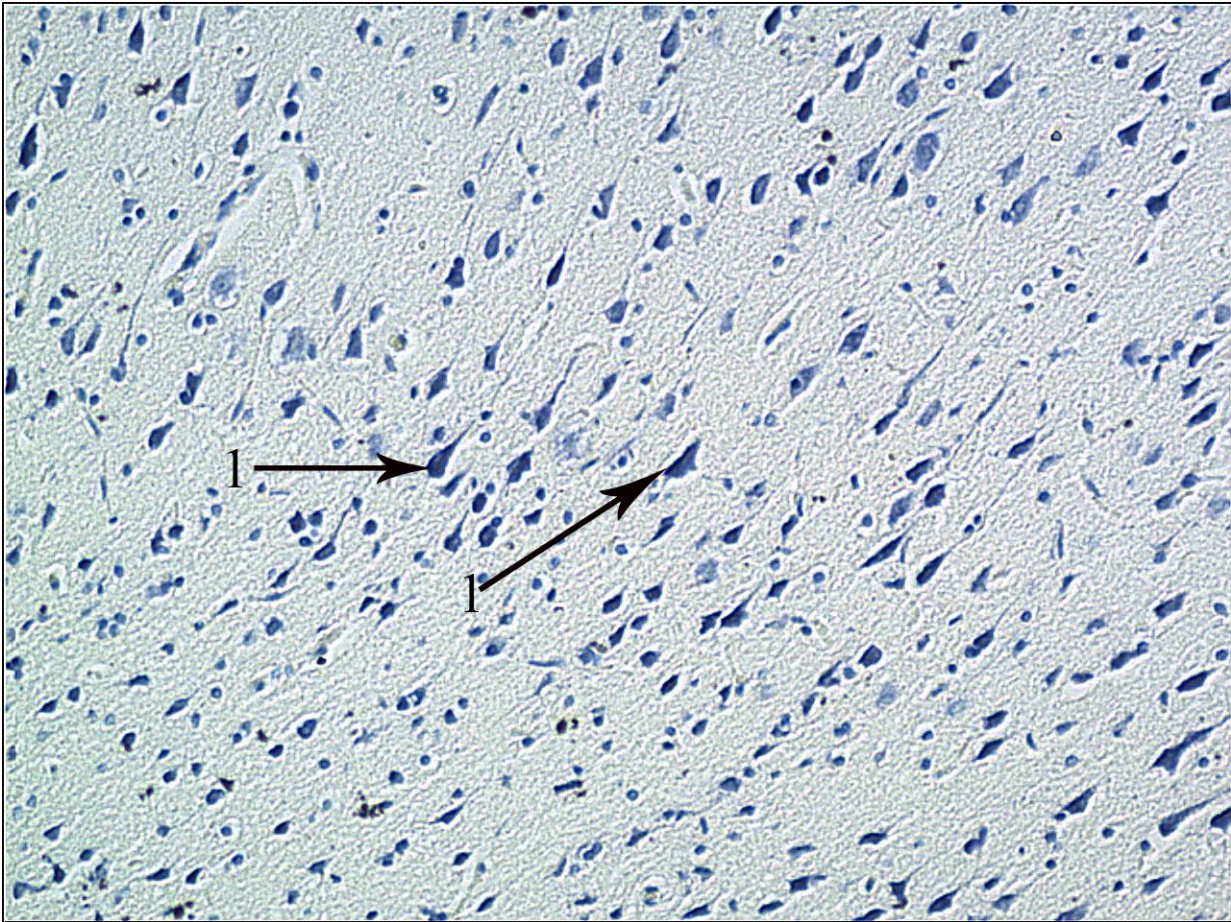
Slika 12B. HE, 200x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa



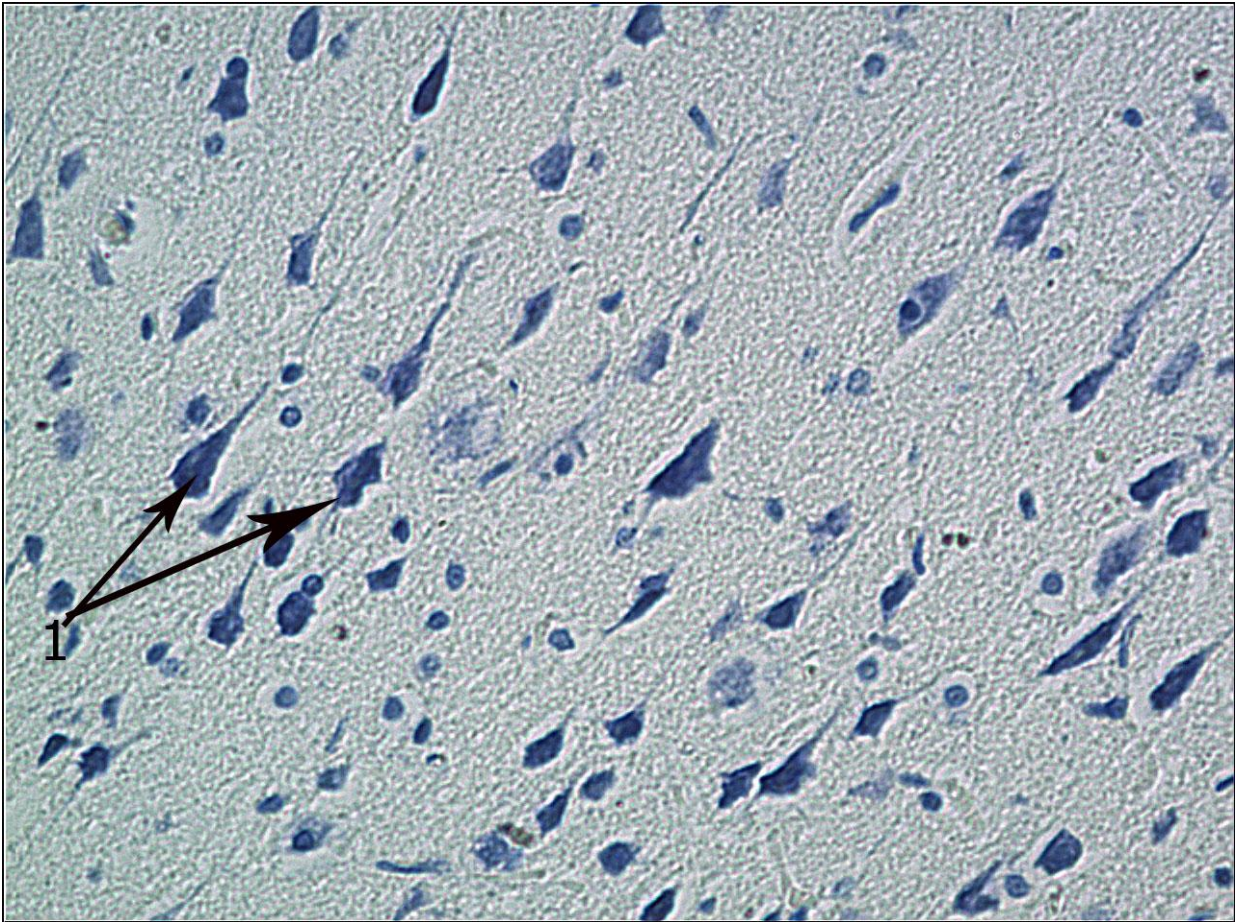
Slika 13B. Van Gieson, 100x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa



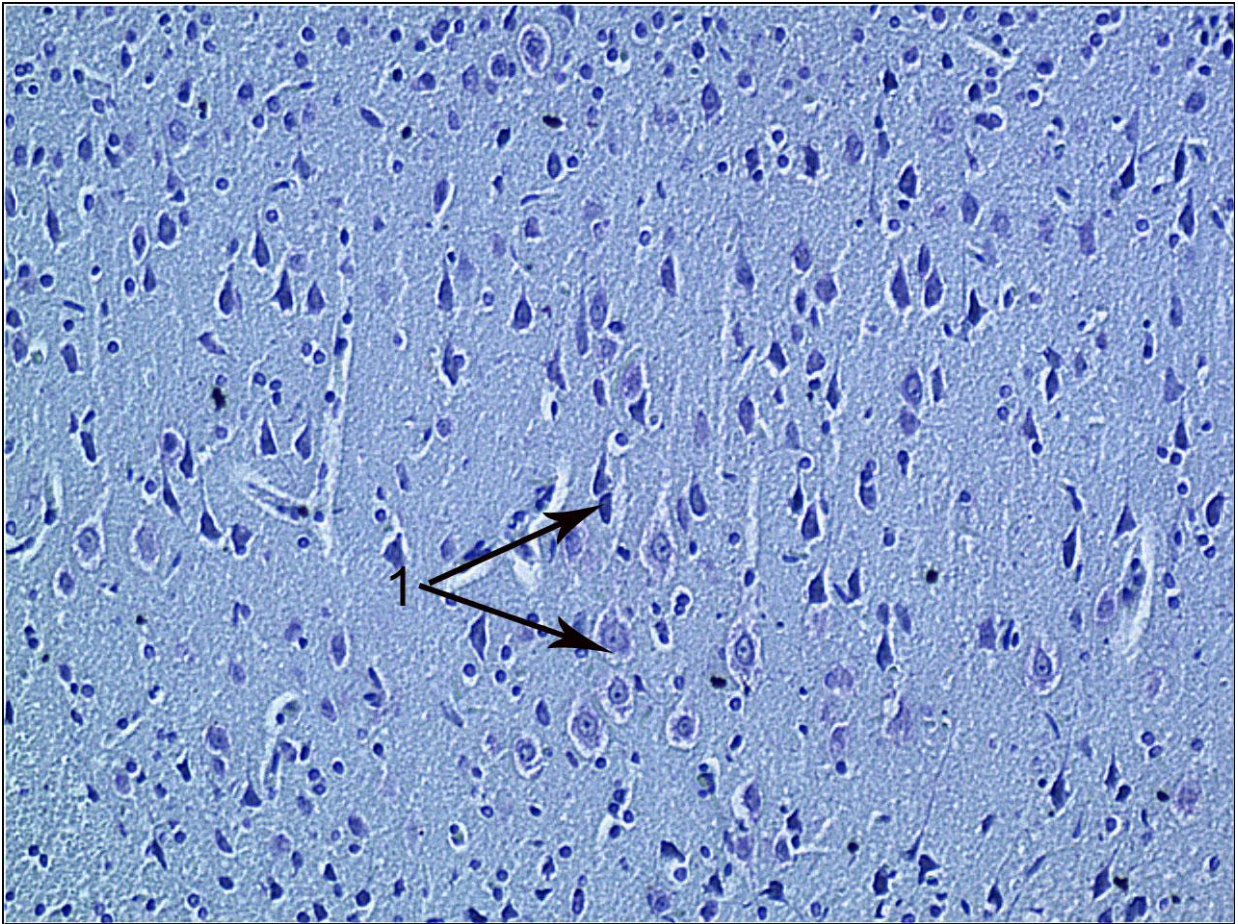
Slika 13C. Van Gieson, 200x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa



Slika 14A. Tionin, 100x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa

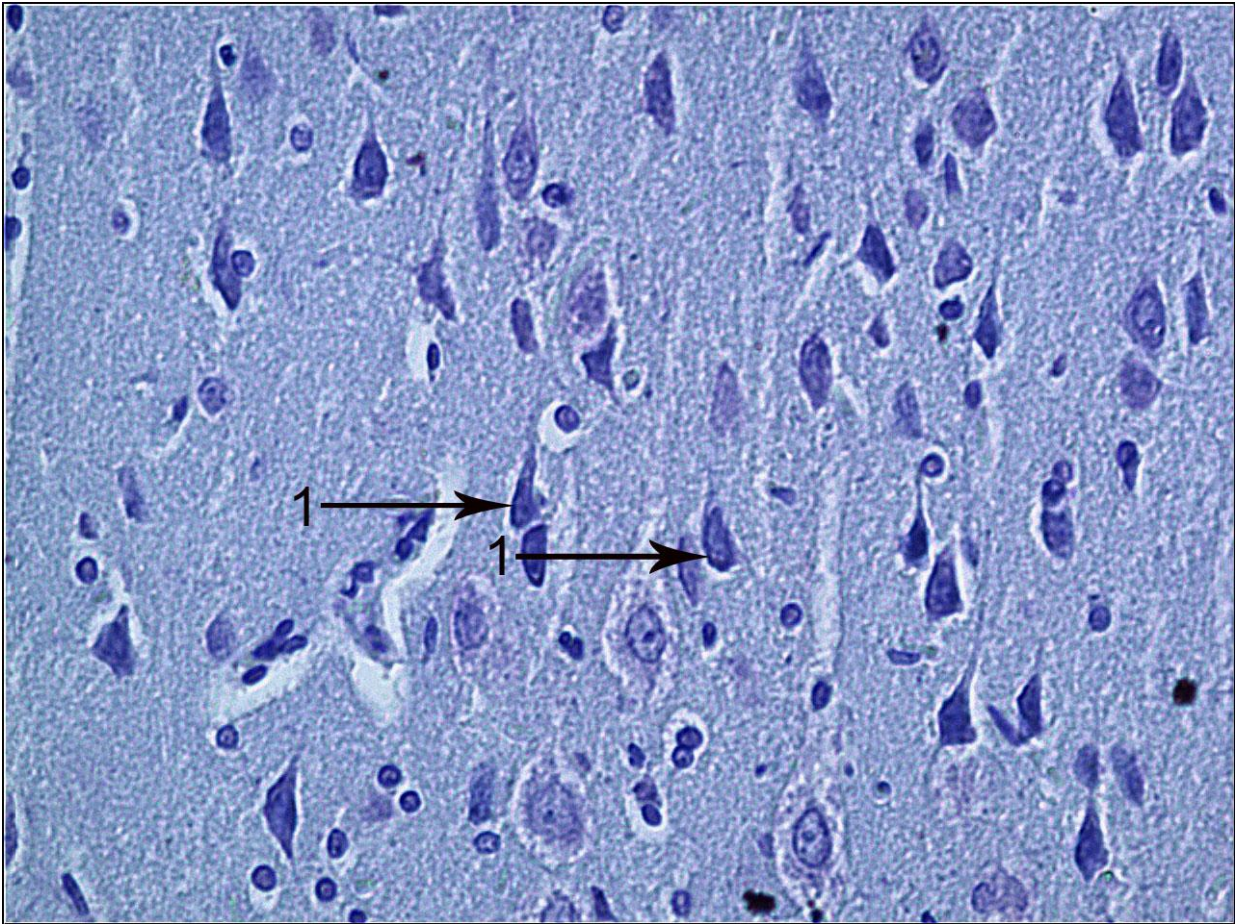


Slika 14B. Tionin, 200x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa



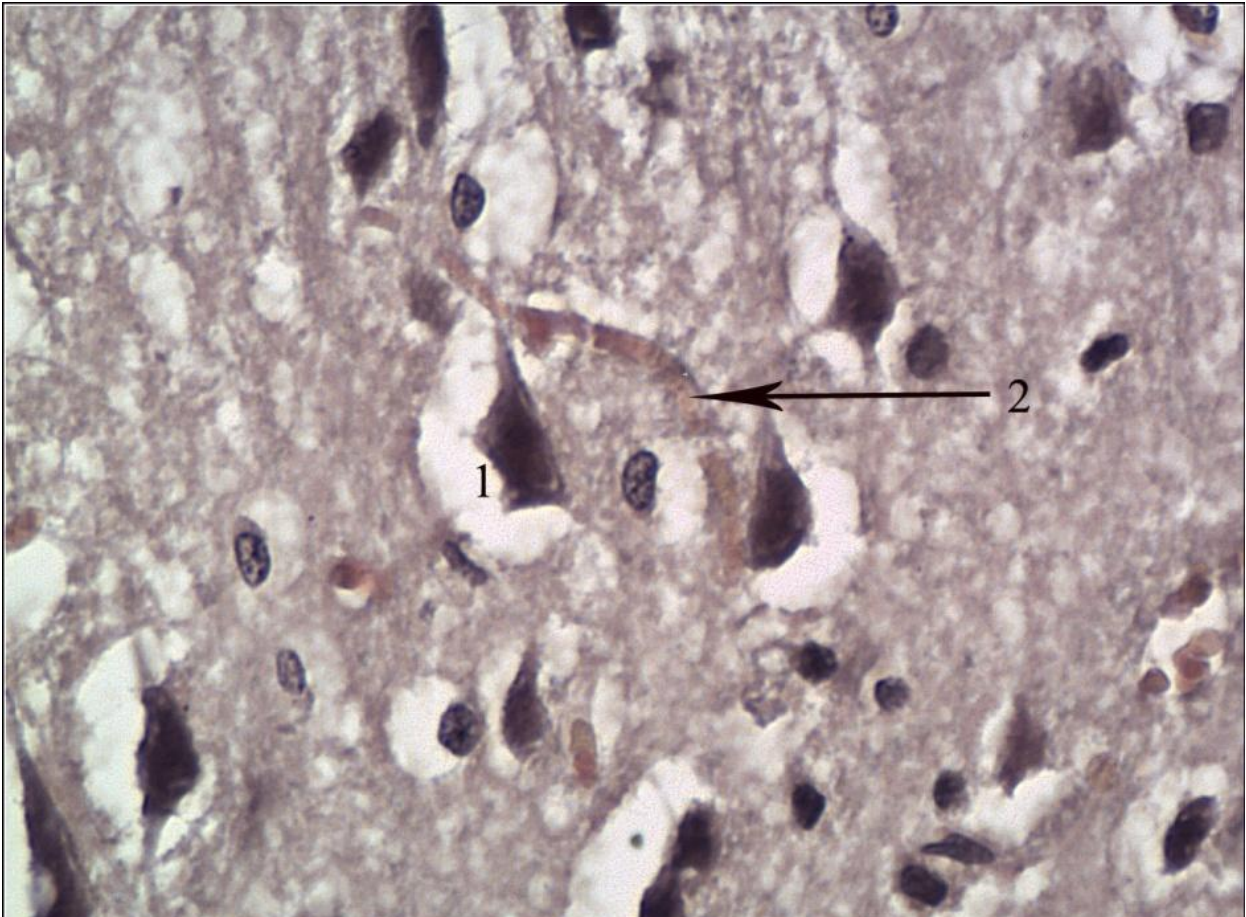
Slika 15A. Krezil fast violet, 100x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa





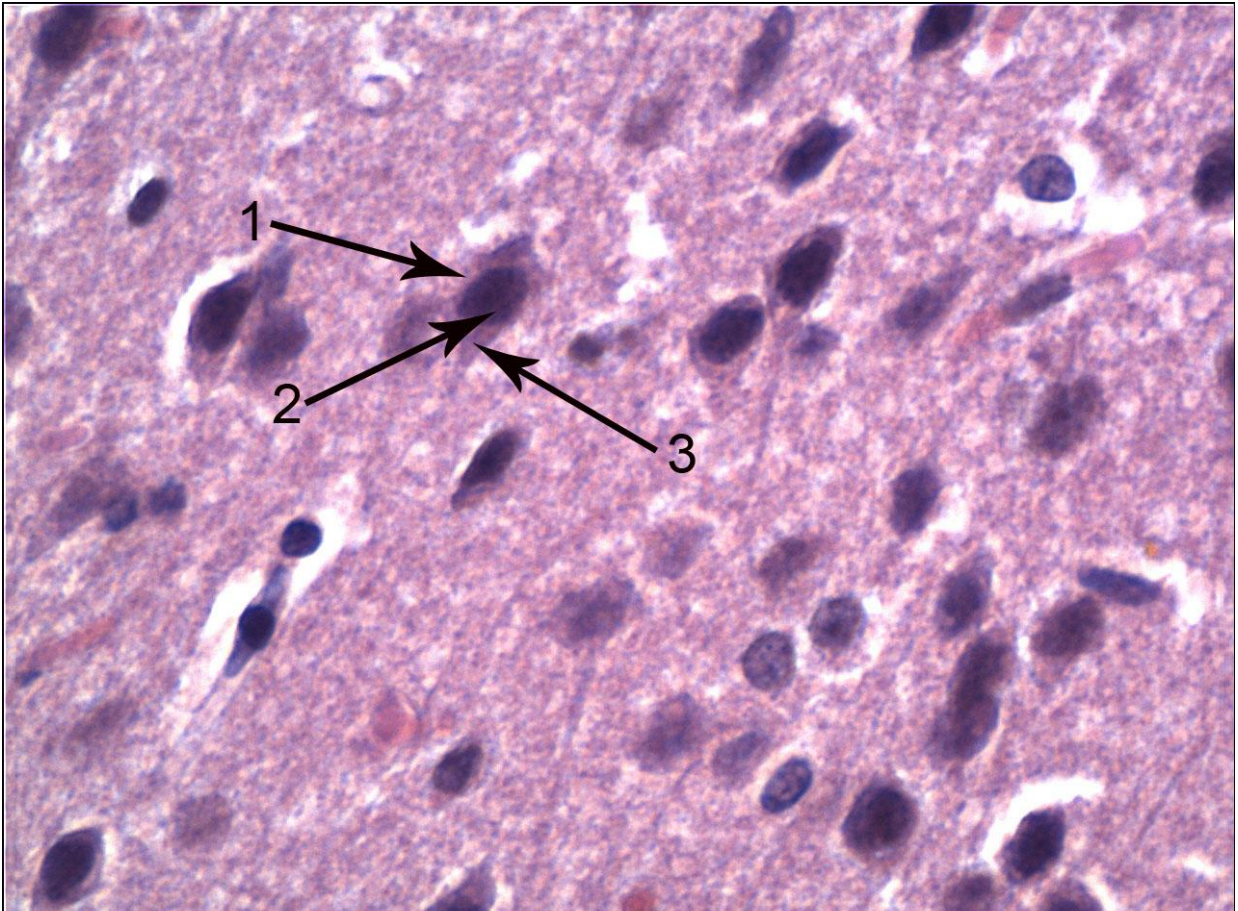
Slika 15B. Krezil fast violet, 200x, 1. magnocelularni neuroni hipotalamusa

Magnocelularne neurone vidimo kao velike, grupisane neurosekretorne neurone, gusto prošarane kapilarima (slika 16).

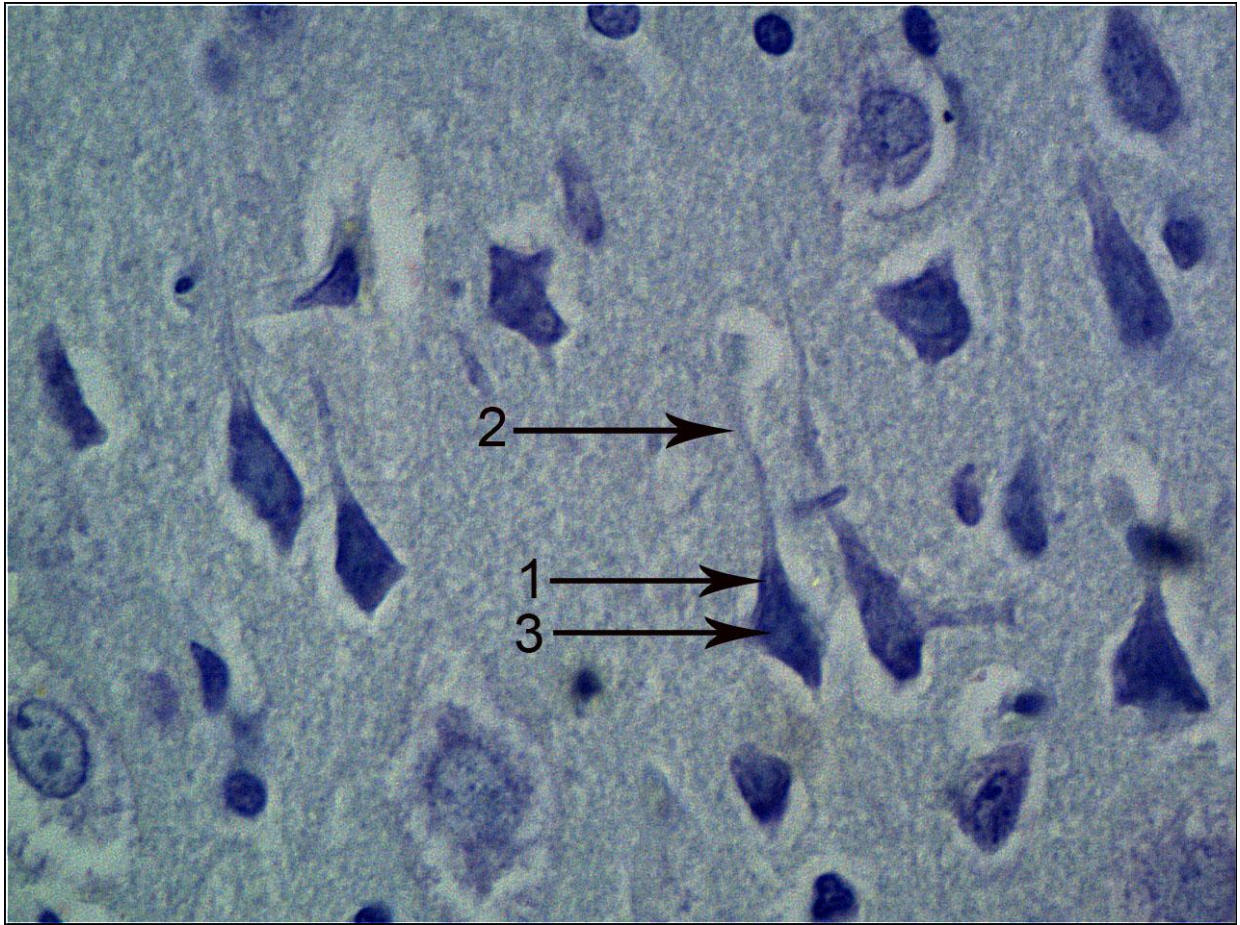


Slika 16. Van Gieson, 400x, 1. magnoćelularni neuroni, 2. kapilar

Izdvajaju se svojim dimenzijama, razgranatošću dendrita i dugim aksonima. Uočavaju se njihova velika euhromatizovana jedra, kao i veliki broj razvijenih organela (slika 17, 18 i 19).

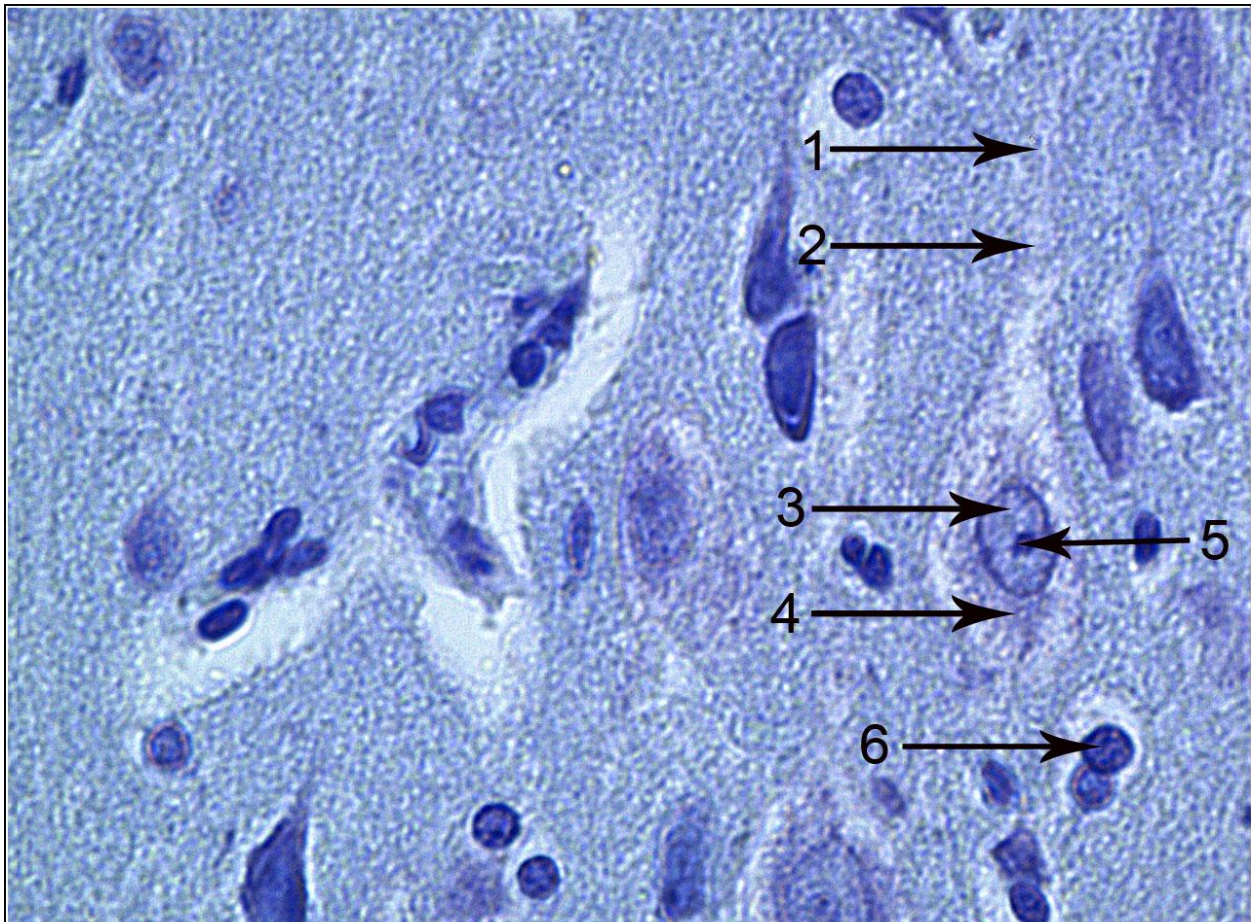


Slika 17. HE, 400x, 1. magnocelularni neuron, 2. nucleus, 3. citoplazma

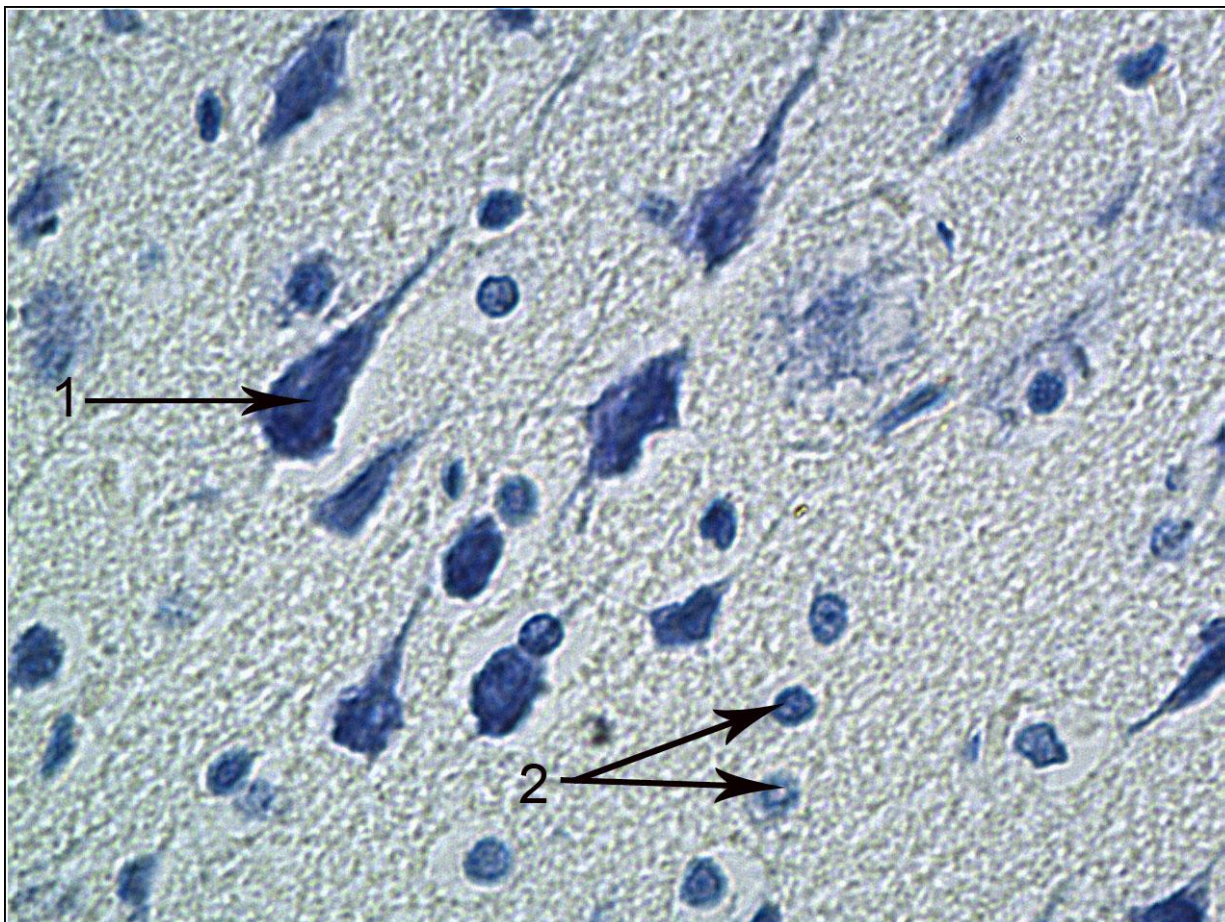


Slika 18. Krezil fast violet, 400x, 1. magnocelularni neuron, 2. dendrit, 3. jedro

Pored velikih neurosekretornih neurona u kaudalnom delu paraventricularnog jedra nalaze se i izolovane ili male grupe ćelija i to su parvocelularne peptidergičke ćelije (slike 19 i 20).



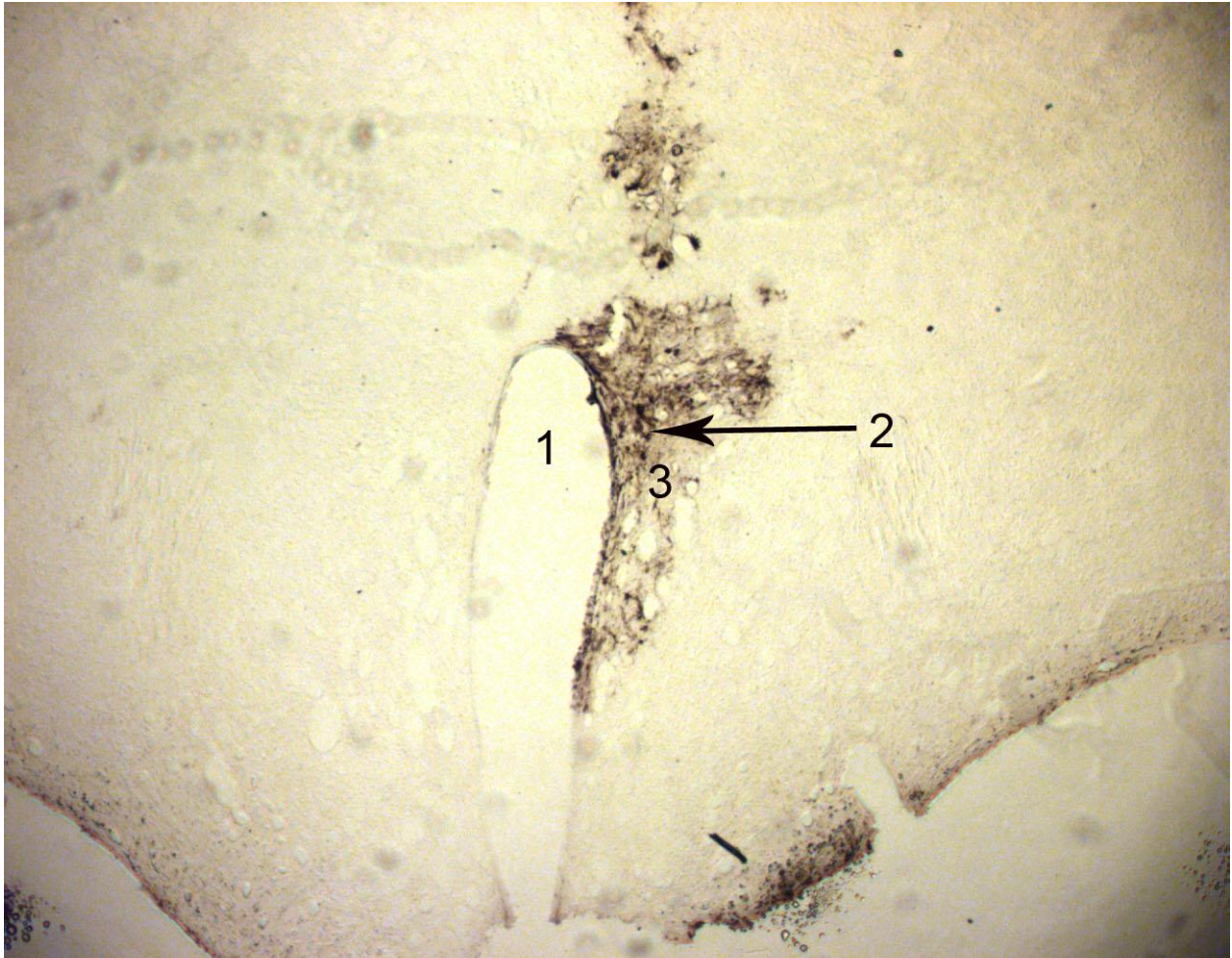
Slika 19. Krezil fast violet, 400x, 1. magnocelularni neuron, 2. dendrit, 3. jedro, 4. citoplazma, 5. jedarce, 6. parvocelularna peptidergička ćelija



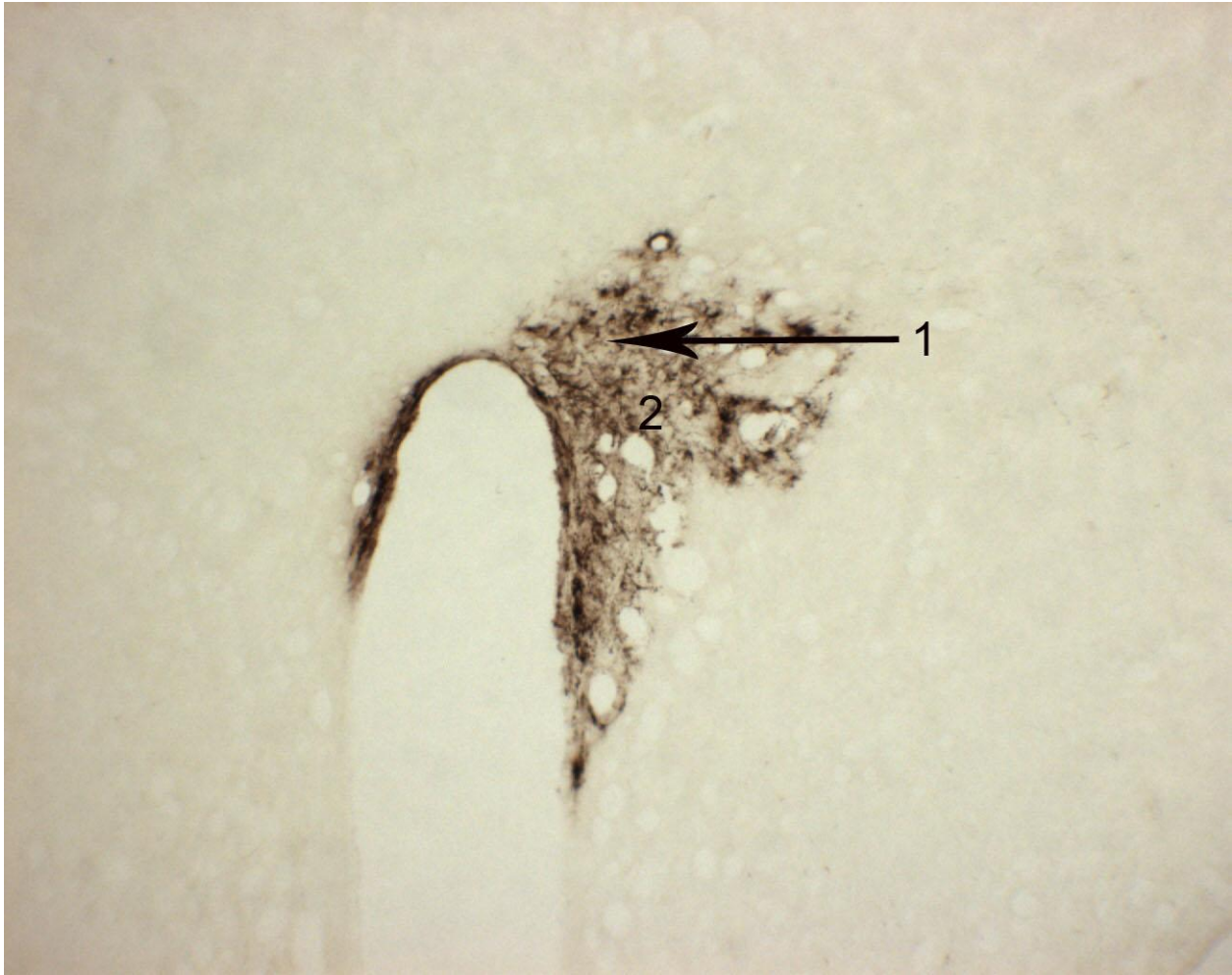
Slika 20. Tionin, 400x, 1. magnocelularni neuron, 2. peptidergička ćelija

### **5.6. Morfološka verifikacija hiperekspresije vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora nakon transfekcije adenovirusima**

Na histološkim preparatima dobijenim imunohistohemijskom metodom vidimo obojene magnocelularne neurone grupisane levo lateralno od treće moždane komore. Na tom mestu su 10 dana ranije pacovi unilateralno transfecirani sa Ad.CMV.eGFP i Ad.CMV.V2 (1:1). Ti pojedinačni hipokampalni magnocelularni neuroni u paraventrikularnom jedru sadrže eGFP (vezali su antitela na eGFP) što znači da su iz primarne kulture hiperekspimiranih vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (slika 15, 16 i 17).

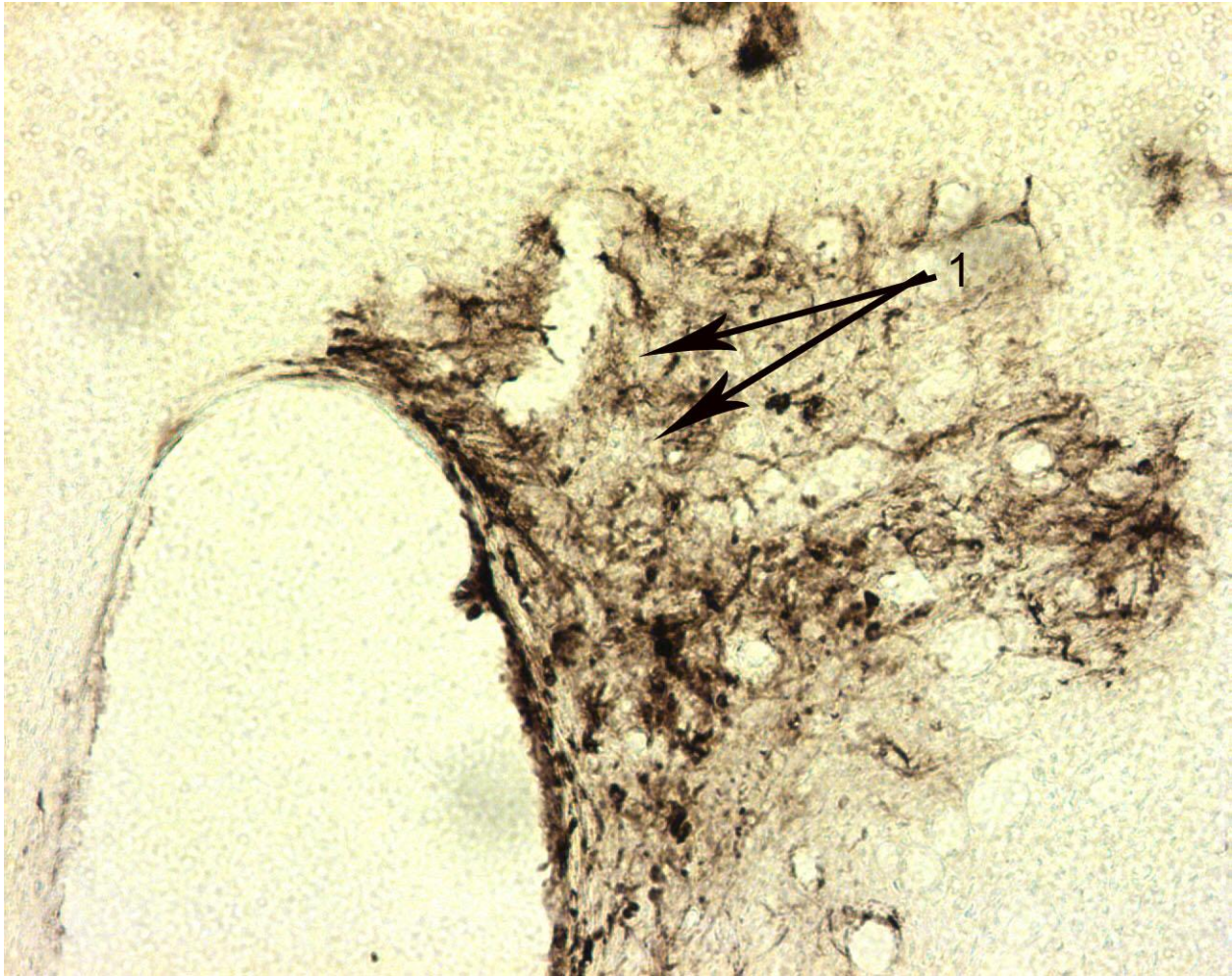


Slika 21. Imunopozitivnost magnocelularnih neurona na eGFP, 25x, 1. treća moždana komora, 2. magnocelularni neuroni, 3. paraventrikularno jedro



Slika 22. Imunopozitivnost magnocelularnih neurona na eGFP, 40x, 1. paraventrikularno jedro, 2. magnocelularni neuroni





Slika 23. Imunopozitivnost magnocelularnih neurona na eGFP, 100x, 1.magnocelularni neuroni

**5.7 Efekti transfekcije adenovirusnih vektora sa eGFP i vazopresinskim V<sub>2</sub> receptorima u odnosu na pacove sa transfeciranim eGFP, kao kontrolnom grupom, na kardiovaskularne parametre u bazalnim uslovima**

Efekti hiperekspresije vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora na arterijski krvni pritisak i srčanu frekvenciju, kao i njihov varijabilitet, prikazani su u tabeli 5 i grafikonima 23 i 24.

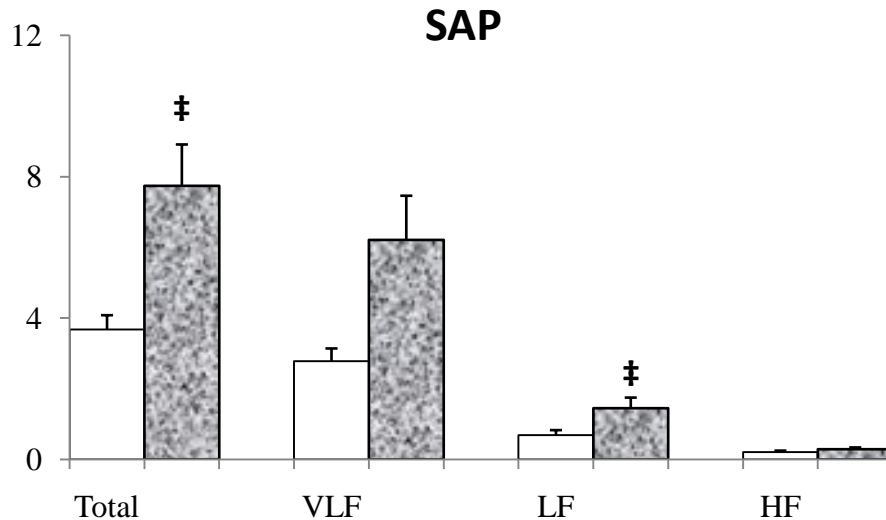
U tabeli 5 hiperekspresija vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora nije izazvala statistički značajne promene arterijskog krvnog pritiska i srčane frekvencije u bazalnim uslovima.

**Tabela 5. Efekti transfekcije adenovirusnih vektora sa eGFP i vazopresinskim V<sub>2</sub> receptorima u odnosu na pacove sa transfeciranim eGFP, kao kontrolnom grupom, na arterijski krvni pritisak i srčanu frekvenciju u bazalnim uslovima**

<b>Eksp. grupe</b>	<b>eGFP</b>	<b>V<sub>2</sub>R + eGFP</b>
<b>SAP (mmHg)</b>	117,9 ± 5,1	117,8 ± 6,0
<b>DAP (mmHg)</b>	88,7 ± 3,0	86,5 ± 5,4
<b>HR (bpm)</b>	340,6 ± 16,6	362,4 ± 14,0

Vrednosti parametara u tabeli predstavljaju srednju vrednost od šest eksperimenata ± S.E.M.. Sistolni arterijski pritisak (SAP), dijastolni arterijski pritisak (DAP) i srčana frekvencija (SF).

Na grafikonu 22 vidimo statistički značajno povećanje ukupne sume oscilacija i oscilacija niskih frekvenci sistolnog arterijskog pritiska kod pacova sa hiperekspresijom vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora u bazalnim uslovima (grafikon 22).

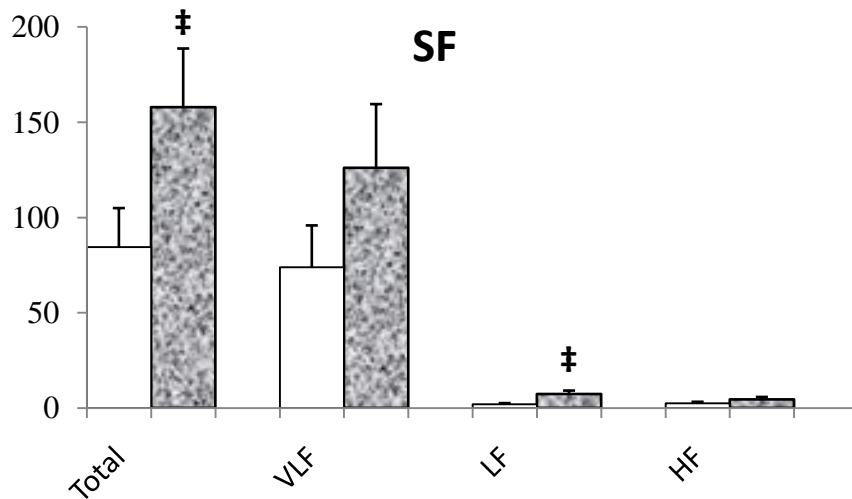


**Grafikon 22. Efekti transfekcije adenovirusnih vektora sa eGFP i vazopresinskim V<sub>2</sub> receptorima u odnosu na pacove sa transfeciranim eGFP, kao kontrolnom grupom, na varijabilitet sistolnog arterijskog pritiska u bazalnim uslovima.**

Kod pacova sa hiperekspresijom V<sub>2</sub> receptora povećala se suma ukupnih oscilacija SAP, kao i LF komponenta SAP.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolnu grupu pacova, a prebojeni stubići su pacovi sa hiperekspresijom V<sub>2</sub> receptora. Total je ukupna suma svih oscilacija SAP; VLF su oscilacije veoma niskih frekvenci SAP; LF su oscilacije niskih frekvenci SAP; HF su oscilacije visokih frekvenci SAP. ‡ je  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu pacova.

Na grafikonu 23 vidimo statistički značajno povećanje ukupne sume oscilacija i oscilacija niskih frekvenci srčane frekvencije kod pacova sa hiperekspresijom vazopresinskih V<sub>2</sub> receptora (grafikon 23).



**Grafikon 23. Efekti transfekcije adenovirusnih vektora sa eGFP i vazopresinskim V<sub>2</sub> receptorima u odnosu na pacove sa transfeciranim eGFP, kao kontrolnom grupom, na varijabilitet srčane frekvence (SF) u bazalnim uslovima.**

Kod pacova sa hiperekspresijom V<sub>2</sub> receptora povećala se suma ukupnih oscilacija SF, kao i LF komponenta SF.

Stubići predstavljaju srednju vrednost od 6 eksperimenata ± S.E.M. Nebojeni stubići predstavljaju kontrolnu grupu, a prebojeni stubići su pacovi sa hiperekspresijom V<sub>2</sub> receptora. Total je ukupna suma svih oscilacija SF; VLF su oscilacije veoma niskih frekvenci SF; LF su oscilacije niskih frekvenci SF; HF su oscilacije visokih frekvenci SF. ‡ je  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu pacova.

## 6. DISKUSIJA

U ovom istraživanju pokazali smo da u bazalnim fiziološkim uslovima, antagonist  $V_2$  vazopresinskih receptora ubrizgan intracerebroventrikularno neanestetisanim normotenzivnim pacovima, povećava varijabilitet krvnog pritiska u zoni oscilacija veoma niskih frekvenci ne menjajući visinu krvnog pritiska i srčane frekvencije. Kod pacova sa povećanom ekspresijom  $V_2$  vazopresinskih receptora u paraventricularnom jedru hipotalamusa u bazalnim fiziološkim uslovima došlo je do povećanja varijabiliteta krvnog pritiska u zoni niskih frekvencija u odnosu na kontrolne životinje, dok visina krvnog pritiska i srčane frekvencije nije bila promenjena. Stres imobilizacijom izazvao je porast krvnog pritiska i srčane frekvencije, kao i porast varijabiliteta krvnog pritiska u zonama niskih i visokih frekvencija. Stres mlazom vazduha pod pritiskom izazvao je iste efekte na krvni pritisak, srčanu frekvenciju i varijabilitet krvnog pritiska, kao i stres imobilizacijom. Pacovi pretretirani  $V_2$  antagonistom izloženi stresu mlazom vazduha, imali su značajno manji porast arterijskog krvnog pritiska i porast njegovog varijabiliteta (niskofrekventnih i visokofrekventnih oscilacija), i značajno brži oporavak, tj. vreme potrebno da se normalizuje arterijski krvni pritisak i srčana frekvencija.

U našim eksperimentima kod pacova tretiranih antagonistom  $V_2$  vazopresinskih receptora, pod bazalnim fiziološkim uslovima, nije došlo do značajnih promena krvnog pritiska i srčane frekvencije. Najverovatnije u bazalnim fiziološkim uslovima vazopresin ne učestvuje u regulaciji krvnog pritiska što je u skladu sa rezultatima Imaia i saradnika koji su merili kardiovaskularne parametre pacovima nakon intracerebroventrikularne aplikacije vazopresinskog agoniste i antagonistu (103).

U našem radu prvi put pokazujemo da antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora deluje na varijabilitet arterijskog krvnog pritiska i to na oscilacije veoma niskih frekvenci. Nastanku oscilacija veoma niskih frekvenci u sistemske cirkulaciji najviše doprinose renalna i enteralna cirkulacija (36, 102, 108, 125), termoregulacija i protok krvi kroz kožu (102, 125, 108). Neuroendokrini mehanizmi kao što su renin angiotenzinski sistem, bradikinin (54), azot monoksid (163), vazopresin (112) i drugi vazoaktivni mehanizmi, takođe generišu oscilacije veoma niskih frekvenci. Međutim, poznato je da se neurogeni mehanizmi, pre svega baroreceptorski refleks, suprotstavljaju oscilacijama veoma niskih frekvenci krvnog pritiska. To

je pokazano u eksperimentima u kojima je farmakološkim (109) ili hirurškm (16, 144) putem prekinut baroreceptorski luk što je dovelo do uvećanja oscilacija veoma niskih frekvenci krvnog pritiska. Dobro je poznato da vazopresin modulira rad baroreceptorskog refleksa povećavajući njegovu senzitivnost kod pacova (67, 83, 155, 205, 212) i kod zečeva (25, 141). Cowley i saradnici (1974) pokazali su da elektrolitička destrukcija aree postreme poništava ovaj modulatorni efekat periferno datog vazopresina na baroreceptorski refleks (41). Usledile su brojne potvrde kod različitih vrsta životinja da je area postrema mesto gde vazopresin modulira baroreceptorski refleks (42, 44, 85, 149, 204), ali još uvek nije razjašnjen mehanizam kojim vazopresin to čini. Vazopresin periferno povećava barorefleksnu senzitivnost preko  $V_{1a}$  receptora, zaključili su Elliot i saradnici (55). Antagonist vazopresinskih  $V_{1a}$  receptora, dat direktno u areu postremu zeca, poništio je barorefleksnu inhibiciju renalne simpatičke nervne aktivnosti izazvanu vazopresinom na osnovu čega su Hasser i Bishop zaključili da vazopresin potencira barorefleksnu aktivnost u arei postremi preko  $V_{1a}$  receptora (85). Koshimizu je sa saradnicima razvio model miša bez ekspresije gena za  $V_{1a}$  receptor. Direktnim farmakološkim stimulacijama holinergičkih i adrenergičkih receptora srca, kao i električnom stimulacijom vagusnog nerva miša, Koshimizu je uočio oslabljen aferentni prenos signala nervus vagusom do nucleus tractus solitariusu. Hibridizacijom *in situ* pokazao je da miševi sa fiziološkim brojem vazopresinskih  $V_{1a}$  receptora poseduju najveći broj ovih receptora u arei postremi i nucleus tractus solitariusu. Rezultati eksperimenata Koshimizua i sar. pokazuju da vazopresin preko  $V_{1a}$  receptora u arei postremi povećava senzitivnost baroreceptorskog refleksa (127). Nasuprot navedenim studijama, Brizzee i Walker su pokazali da stimulacija baroreceptorskog refleksa pacova agonistom vazopresinskih  $V_2$  receptora, može biti inhibirana antagonistom vazopresinskih  $V_{1a}$  ili antagonistom vazopresinskih  $V_2$  receptora. Tako je pokazano da oba receptora imaju ulogu u baroreceptorskom refleksu ili da antagonisti deluju neselektivno na različite tipove vazopresinskih receptora (29). Agonist  $V_2$  vazopresinskih receptora dat Wistar (29) i *Blattleboro* pacovima (103), vrsti pacova kojima nedostaje endogeni vazopresin, povećava senzitivnost baroreceptorskog refleksa što potvrđuje da vazopresin stimuliše baroreceptorski refleks preko vazopresinskih  $V_2$  receptora. Mesto dejstva antagoniste vazopresinskih  $V_2$  receptora ispitivao je Unger sa saradnicima predhodno tretirajući pacove antagonistima vazopresinskih  $V_{1a}$  ili  $V_2$  receptora. Merio je pacovima baroreceptorski refleks izazvan alfa

adrenergičkim agonistom, metoksaminom. Antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora, dat intravenski, povećao je senzitivnost baroreceptorskog refleksa, dok intravenski dat antagonist vazopresinskih  $V_{1a}$  receptora nije imao efekta. Intracerebroventrikularno dat antagonist vazopresinskih  $V_{1a}$  receptora inhibisao je efekte baroreceptorskog refleksa. Verovatno vazopresin povećava senzitivnost baroreceptorskog refleksa preko vazopresinskih  $V_2$  receptora lokalizovanih izvan hematoencefalne barijere, a inhibiše preko vazopresinskih  $V_{1a}$  receptora lokalizovanih unutar hematoencefalne barijere (205). Iste rezultate, ali kod hipertenzivnih pacova, dobili su Sampey i saradnici. Intravenski su ubrizgavali vazopresinskog  $V_{1a}$ , ili  $V_2$ , antagonistu normotenzivnim i hipertenzivnim pacovima i pokazali da antagonist  $V_2$  vazopresinskih receptora smanjuje osetljivost baroreceptorskog refleksa kod hipertenzivnih pacova, dok antagonist  $V_{1a}$  vazopresinskih receptora nije imao efekta, ni kod normotenzivnih, ni kod hipertenzivnih pacova (179). Nakayama je sa saradnicima ubrizgavao vazopresinski  $V_{1a}$ , ili  $V_2$ , antagonist u areu postremu, normotenzivnih i hipertenzivnih pacova što je smanjilo osetljivost baroreceptorskog refleksa (149). Na osnovu naših eksperimenata mi ne možemo da identifikujemo mesto dejstva antagoniste vazopresinskih  $V_2$  receptora na varijabilitet arterijskog krvnog pritiska. S obzirom da smo ubrizgavali  $V_2$  antagonist u lateralnu komoru mozga on je mogao delovati na neku od obližnjih struktura u kojima su identifikovani vazopresinski  $V_2$  receptori: na PVN (84, 149, 214), periakveduktalnu sivu masu (215) i/ili na areu postremu (138, 168, 204). S obzirom da je Japundžić-Žigon (2002) pokazala da intravenski ubrizgan selektivni antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora takođe povećava oscilacije veoma niskih frekvenci krvnog pritiska (113), logično je pretpostaviti da je i u našim eksperimentima, vazopresinski antagonist ubrizgan intracerebroventrikularno blokirao vazopresinske  $V_2$  receptore u arei postremi koja je dostupna sa obe strane hematoencefalne barijere. Na taj način vazopresinski  $V_2$  antagonist smanjio je senzitivnost baroreceptorskog refleksa i prouzrokovao povećanje oscilacija veoma niskih frekvencija krvnog pritiska.

Povećanje broja vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru, pod bazalnim fiziološkim uslovima, u našim eksperimentima izazvao je drugačije efekte na krvni pritisak od intracerebroventrikularno ubrizganih vazopresinskih  $V_2$  antagonista. To dodatno potvrđuje da farmakološki efekti antagoniste vazopresinskih  $V_2$  receptora nisu bili izazvani stimulacijom vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru. Pod bazalnim fiziološkim uslovima kod

pacova sa hiperekspresijom vazopresinskih  $V_2$  receptora, došlo je do povećanja niskofrekventnih oscilacija kratkotrajnog varijabiliteta krvnog pritiska i srčane frekvencije i to bez promena krvnog pritiska i srčane frekvencije. Oscilacije niskih frekvencija krvnog pritiska i srčane frekvencije odražavaju povećanje simpatičkog uticaja na srce i krvne sudove (8, 109, 112, 143). Naši rezultati pokazuju da povećanje broja vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru, što smo imunohistohemijski potvrdili analizom histoloških isečaka hipotalamusa, potencira autokrinu ulogu vazopresina. Vazopresin se oslobađa iz dendrita i tela neurona i dovodi do povećanja okidanja magnocelularnih neurona, koji se projektuju u rostro ventrolateralnu medulu gde se formira simpatički tonus prema srcu i krvnim sudovima (38, 211). Porast niskofrekventne komponente arterijskog krvnog pritiska i srčane frekvencije kod pacova sa povećanim brojem vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru, u našim eksperimentima, pokazuje da vazopresinski  $V_2$  receptori u paraventrikularnom jedru mogu imati važnu fiziološku, a možda i patofiziološku ulogu.

Važnu fiziološku ulogu vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru potvrđuju eksperimenti na pacovima prethodno tretiranim antagonistom  $V_2$  receptora, pa potom izlaganih stresu mlazom vazduha. Stres mlazom vazduha izaziva naglašen odbrambeni odgovor sa paničnom reakcijom, porastom krvnog pritiska i srčane frekvencije (17). Kod pacova prethodno tretiranih antagonistom  $V_2$  receptora efekti stresa na krvni pritisak, varijabilitet krvnog pritiska i srčane frekvencije bili su umanjeni, što ukazuje da je vazopresin medijator kardiovaskularnog odgovora na stres i da to čini stimulacijom vazopresinskih  $V_2$  receptora, najverovatnije lokalizovanih u paraventrikularnom jedru. Paraventrikularno jedro je glavno mesto integracije endokrinog, emocionalnog i autonomnog odgovora na stres (90, 184). Analizirajući naše histološke preparate hipotalamusa uočili smo veliki broj magnocelularnih i okolnih parvocelularnih neurona grupisanih u paraventrikularnom jedru. Iz parvocelularnih neurona direktne aksonske projekcije završavaju se u neurohipofizi odakle se u cirkulaciju luči vazopresin koji deluje antidiuretski, vazokonstriktorno (12, 80, 95) i u ekstremnim situacijama hemoragičkog šoka bradikardično produžavajući život (188, 190, 217). Iz magnocelularnog dela paraventrikularnog jedra aksonske projekcije se spuštaju direktno do medule oblongate (56, 114), rostroventrolateralne medule, nucleus tractus solitarius i intermediolateralne kolumne lateralnog roga kičmene moždine, gde vazopresin moduliše simpatički i vagalni tonus krvnih sudova (192,



194, 195). Paraventricularno jedro ima direktne neuralne veze i sa drugim delovima hipotalamusa – dorzomedijalnim jedrom hipotalamusa, limbičkim sistemom i prefrontalnim korteksom, gde vazopresin utiče na emocije i ponašanje (34, 180, 199, 219). Paraventricularno jedro projektuje aksone i na mesta važna u regulaciji kardiorespiratorne funkcije. Aksoni iz dorzalnog, ventralnog i medijalnog parvocelularnog dela paraventricularnog jedra projektuju se u intermediolateralnu kolumnu i fenična motorna jedra, u kičmenoj moždini, i u rostroventrolateralnu medulu i pre-Bötzing-ov kompleks (interneuronu ventralne respiratorne kolumne), u produženoj moždini (120, 122). Naši rezultati sugerišu da vazopresin aktivacijom vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventricularnom jedru, u stresu, povećava respiratorni volumen. Takođe, vazopresin povećava oscilacije visokih frekvenci krvnog pritiska i simpatički tonus prema arteriolama i srcu čime povećava ne samo niskofrekventnu komponentu varijabiliteta krvnog pritiska, već i sam krvni pritisak i srčanu frekvenciju. Povećanje udisaja omogućava bolju oksigenaciju krvi i veći dotok krvi srcu čime se podstiče cirkulacija. Porast oscilacije visokih frekvenci srčane frekvencije koja je vagovagalnog porekla nagoveštava da vazopresin u stresu štiti srce od prekomerne simpatičke stimulacije. Istovremeno su naši rezultati pokazali da vazopresinski  $V_2$  receptori ne menjaju lučenje adrenokortikotropnog hormona i kortikosterona u stresu izazvanom mlazom vazduha. Interesantno je da antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora nije modifikovao efekte stresa imobilizacijom na krvni pritisak, srčanu frekvenciju i njihov varijabilitet. Najverovatnije stres imobilizacijom stimuliše drugačije neuroendokrine mehanizme od stresa mlazom vazduha pod pritiskom (20, 185).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Pod bazalnim fiziološkim uslovima antagonist  $V_2$  vazopresinskih receptora ubrizgan intracerebroventrikularno nema uticaj na vrednosti krvnog pritiska i srčane frekvencije, ali izaziva promene varijabiliteta arterijskog krvnog pritiska u zoni veoma niskih frekvencija krvnog pritiska, ukazujući na **ulogu vazopresina i centralnih vazopresinskih  $V_2$  receptora, najverovatnije lokalizovanih u arei postremi, u modulaciji varijabiliteta krvnog pritiska kroz povećanje senzitivnosti baroreceptorskog refleksa.**
2. Hiperekspresija vazopresinskih  $V_2$  receptora u paraventrikularnom jedru hipotalamusa prouzrokovala je povećanje oscilacija niskih frekvencija krvnog pritiska i srčane frekvencije, pod bazalnim fiziološkim uslovima, ukazujući **na značaj vazopresina i centralnih vazopresinskih  $V_2$  receptora u autokrinnoj regulaciji magnocelularnih neurona paraventrikularnog jedra i neurogenoj kontroli cirkulacije.**
3. U uslovima ekspozicije stresu mlazom vazduha pod pritiskom, antagonist vazopresinskih  $V_2$  receptora ubrizgan intracerebroventrikularno smanjio je efekte stresa na krvni pritisak i srčanu frekvencu, i njihov varijabilitet, u zonama niskih i visokih frekvenci krvnog pritiska, i ubrzao oporavak krvnog pritiska i srčane frekvence. Rezultati sugerišu da **vazopresin i centralni  $V_2$  receptori, najverovatnije lokalizovani u paraventrikularnom jedru, učestvuju u medijaciji neurogene kontrole kardiovaskularnog i respiratornog odgovora na stres.**

## 8. LITERATURA

1. Acher R, Chauvet J. La structure de la vasopressin de boeuf. *Biochim Biophys Acta* 1953;12:487–88.
2. Acher R, Chauvet J, Rouillé Y. Adaptive evolution of water homeostasis regulation in amphibians: vasotocin and hydrins. *Biol Cell*. 1997;89:283-91.
3. Ade T, Segner H, Hanke W. Hormonal response of primary hepatocytes of the clawed toad, *Xenopus laevis*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995;103:21-7.
4. Agre P, Bonhivers M, Borgnia M.J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J Biol Chem*. 1998;273(24):14659-62.
5. Aguilera G, Rabadan-Diehl C. Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat. *Exp Physiol*. 2000;85:19S-26S.
6. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981;213; 220-222.
7. Akselrod S, Gordon D, Madwed JB, Snidman NC, Shannon DC, Cohen RJ. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am. J. Physiol*. 1985;249:H867-75.
8. Akselrod S, Eliash S, Oz O, Cohen S. Hemodynamic regulation in SHR: investigation by spectral analysis. *Am J Physiol*. 1987;253:H176-83.
9. Altura BM, Altura BT. Vascular smooth muscle and neurohypophyseal hormones. *Federation Proc*. 1977;36:1853-60.
10. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides* 1989;10:89–93.
11. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol Behav* 1990;48:825–830.
12. Arnolda L, McGrath BP, Cocks M, Johnston CI Vasoconstrictor role for vasopressin in experimental heart failure in the rabbit. *J Clin Invest*. 1986;78:674-9.

13. Bailey TW, Jin YH, Doyle MW, Smith SM, Andresen MC. Vasopressin inhibits glutamate release via two distinct modes in the brainstem. *J Neurosci.* 2006;26(23):6131-42.
14. Balment RJ, Lu W, Weybourne E, Warne JM. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: a review with insights from mammalian models. *Gen Comp Endocrinol.* 2006;147:9-16.
15. Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural Bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol,* 1998; 156:223-229.
16. Barrès C, Lewis SJ, Jacob HJ, Brody MJ. Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. *Am J Physiol.* 1992;263:R639-46.
17. Barrès C, Cheng Y, Julien C Steady-state and dynamic responses of renal sympathetic nerve activity to air-jet stress in sinoaortic denervated rats. *Hypertension.* 2004;43(3):629-35.
18. Baylis PH. Regulation of vasopressin secretion. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1989;3(2):313-30.
19. Bell T, Cleary J, Witten I. Text compression, Prentice-Hall:Englewood Cliffs;1990.
20. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(10):1326-38.
21. Bengtsson LP. Hormonal effects on human myometrial activity. *Vitam Horm.* 1973;31:257-303.
22. Berecek KH, Mah SC, Baum P, Hofbauer KG. Cardiovascular effects of intracerebroventricular injection of vasopressin in unanaesthetized normotensive and DOCA-salt hypertensive rats. *J Hypertens Suppl.* 1984;2:S29-31.
23. Bird IM, Nicol M, Williams BC, Walker SW. Vasopressin stimulates cortisol secretion and phosphoinositide catabolism in cultured bovine adrenal fasciculata/reticularis cells. *J Mol Endocrinol.* 1990;5(2):109-16.
24. Birnbaumer M. Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:406-410.
25. Bishop VS, Hay M. Involvement of the area postrema in the regulation of sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Front Neuroendocrinol.* 1993;14:57-75.

26. Bloom W, Fawcett DW. A Textbook of Histology. 10th ed. Philadelphia, London, Toronto: WB Saunders;1957.
27. Breton JD, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I–II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain* 2008;4:19.
28. 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.
29. Brizzee BL, Walker BR. Altered baroreflex function after tail suspension in the conscious rat. *J Appl Physiol.* 1990;69:2091-6.
30. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 1980;207(4429):373-8.
31. Brunton L, Blumental D, Buxton I, Parker K. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 11 Ed. USA: Mc Graw Hill;2006.
32. Burbach GJ, Dehn D, Del Turco D, Deller T. Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *J Neurosci Methods.* 2003;131:83-91.
33. Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, Gainer H. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiol Rev* 2001;81:1197-267.
34. Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS 3rd. Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol.* 2008;84(1):1-24.
35. Carter RN, Pinnock SB, Herbert J. Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? *Neuroscience* 2004;126:9-19.
36. Cerutti C, Barres C, Paultre C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am J Physiol.* 1994;266(5 Pt 2):H1993-2000.
37. Cho ES, Lee SY, Park JY, Hong SG, Ryu PD. Organotypic slice culture of the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *J Vet Sci.* 2007;8(1):15-20.

38. Cochrane KL, Nathan MA. Normotension in conscious rats after placement of bilateral electrolytic lesions in the rostral ventrolateral medulla. *J Auton Nerv Syst.* 1989;26(3):199-211.
39. Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;689:346-362.
40. Coote JH. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Exp Physiol.* 2004;90:169-173.
41. 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(4):505-14.
42. Cox BF, Hay M, Bishop VS. Neurons in area postrema mediate vasopressin-induced enhancement of the baroreflex. *Am J Physiol.* 1990;258:H1943-6.
43. Cyranowski JM, Hofkens TL, Frank E, Seltman H, Cai HM, Amico JA. Evidence of dysregulated peripheral oxytocin release among depressed women. *Psychosom Med* 2008;70:967–975.
44. Dampney RA, Polson JW, Potts PD, Hirooka Y, Horiuchi J. Functional organization of brain pathways subserving the baroreceptor reflex: studies in conscious animals using immediate early gene expression. *Cell Mol Neurobiol.* 2003;23(4-5):597-616. Review.
45. de Keyzer Y, René P, Beldjord C, Lenne F, Bertagna X. Overexpression of vasopressin (V3) and corticotrophin-releasing hormone receptor genes in corticotroph tumours. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;49:475-82.
46. Diamant M, de Wied D. Differential effects of centrally injected AVP on heart rate, core temperature, and behavior in rats. *Am J Physiol* 1993;264:R51–R61.
47. Dobruch J, Paczwa P, Loń S, Szczepańska-Sadowska E. Centrally applied vasopressin intensifies hypotension and bradycardia after hemorrhage in shr rats. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(2):295-8.
48. Douglas A, Scullion S, Antonijevic I, Brown D, Russell J, Leng G. Uterine contractile activity stimulates supraoptic neurons in term pregnant rats via a noradrenergic pathway. *Endocrinology.* 2001;142(2):633-44.

49. du Vigneaud V, Lawler HC, Popenoe EA. Enzymatic cleavage of glycinamide from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic hormone of the posterior pituitary. *J. Amer. Chem. Soc.* 1953;75:4879-80.
50. du Vigneaud, V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem.* 1953;205,949–957.
51. du Vigneaud V. *Hormones of the Posterior Pituitary Gland: Oxytocin and Vasopressin, The Harvey Lectures 1954–1955.* New York: Academic Press; 1956.
52. Duan YC, Xu B, Shi Z, Gao J, Zhang SJ, Wang W, Chen Q, Zhu GQ. Nucleus of solitary tract mediates cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Pflugers Arch.* 2009;459(1):1-9.
53. Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions. *J Pharmacol Sci.* 2009;109:44-9.
54. Elghozi JL, Laude D, Girard A. Effects of respiration on blood pressure and heart rate variability in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1991;18(11):735-42. Review.
55. Elliott JM, West MJ, Chalmers J. Effects of vasopressin on heart rate in conscious rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;7:6-11.
56. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak C. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Neuroendocrinology* 2004; 25:132-149.
57. Feldman R, Weller A, Zagoory-Sharon O, Levine A. Evidence for a neuroendocrinological foundation of human affiliation: plasma oxytocin levels across pregnancy and the postpartum period predict mother-infant bonding. *Psychol Sci* 2007;18:965–970.
58. Felten DL, Jozefowicz. *Netter's Atlas of Human Neuroscience.* 1st ed. Elsevier - Health Sciences Division; 2003.
59. Ferguson JW, Therapondos G, Newby DE, Hayes PC. Review article. Therapeutic role of vasopressin receptor antagonism in patients with liver cirrhosis. *Clinical Science* 2003;105:1-8.
60. Ferrier L, Serradeil-Le Gal C, Schulte AM, Vasina V, Gaultier E, Schroedel S, Ursino MG, Chaumaz G, Pascal M, De Ponti F, Bueno L. Proinflammatory role of vasopressin

through V1b receptors in hapten-induced experimental colitis in rodents: implication in IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(6):G1298-307.

61. Filep J, Rosenkranz B. Mechanism of vasopressin-induced platelet aggregation. *Thromb Res.* 1987;45(1):7-15.
62. Fisher H, Aron A, Brown LL. Romantic love: an fMRI study of a neural mechanism for mate choice. *J Comp Neurol* 2005;493:58–62.
63. Fisher HE, Aron A, Brown LL. Romantic love: a mammalian brain system for mate choice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:2173–2186.
64. Foletta VC, Brown FD, Young WS 3rd. Cloning of rat ARHGAP4/C1, a RhoGAP family member expressed in the nervous system that colocalizes with the Golgi complex and microtubules. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;107:65–79.
65. Folny V, Raufaste D, Lukovic L, Pouzet B, Rochard P, Pascal M, Serradeil-Le Gal C. Pancreatic vasopressin V1b receptors: characterization in In-R1-G9 cells and localization in human pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E566-76
66. Gabor CS, Phan A, Clipperton-Allen AE, Kavaliers M, Choleris E. Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. *Behav Neurosci.* 2012;126(1):97-109.
67. Gardiner SM, Bennett T. Cardiac baroreflex sensitivities in conscious, unrestrained, Long Evans and Brattleboro rats. *J Auton Nerv Syst.* 1988;23:213-9.
68. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiological Reviews* 2001;81:629-83.
69. Gonzales J, Cordero Valeriano JJ, Rodruquez MF. Autonomic mediation of short-term cardiovascular oscillations after acute hemorrhage in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1995;55:123-30.
70. Gonzalez A, Borquez M, Trigo CA, Brenet M, Sarmiento JM, Figueroa CD, Navarro J, Gonzalez CB. The splice variant of the V2 vasopressin receptor adopts alternative topologies. *Biochemistry.* 2011;50:4981-6.
71. Goodson JL. Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog Brain Res.* 2008;170:3-15.



72. Grazzini E, Breton C, Derick S, Andres M, Raufaste D, Rickwaert F, Boccara G, Colson P, Guérineau NC, Serradeil-le Gal C, Guillon G. Vasopressin receptors in human adrenal medulla and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(6):2195-203.
73. Grazzini E, Lodboerer AM, Perez-Martin A, Joubert D, Guillon G. Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology.* 1996;137(9):3906-14.
74. Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P. 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;99:6370-5.
75. Grindstaff RJ, Grindstaff RR, Sullivan MJ, Cunningham JT. Role of the locus ceruleus in baroreceptor regulation of supraoptic vasopressin neurons in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(1):R306-19.
76. Gryczanski I, Szmackinski H, Laczko G, Wiczek W, Johnson ML, Kusba J, Lakowicz JR. Conformational differences of oxytocin and vasopressin as observed by fluorescence anisotropy decays and transient effects in collisional quenching of tyrosine fluorescence. *Journal of fluorescence* 1991;1(3):163-175.
77. Guillon G, Derick S, Pena A, Cheng LL, Stoev S, Seyer R, Morgat JL, Barberis C, Gal CS, Wagnon J i Manning M. The discovery of novel vasopressin V1b receptor ligands for pharmacological functional and structural investigations. *J Neuroendocrinol* 2004;16:356-361.
78. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:11704-11709.
79. Gwee PC, Amemiya CT, Brenner S, Venkatesh B. Sequence and organization of coelacanth neurohypophysial hormone genes: evolutionary history of the vertebrate neurohypophysial hormone gene locus. *BMC Evol Biol.* 2008;8:93.
80. Hai MA, Thomas S. Influence of prehydration on the changes in renal tissue composition induced by water diuresis in the rat. *J Physiol.* 1969;205:599-618.

81. Hamet P. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(8):2414-22.
82. Hammock EA, Young LJ. Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philos TransR Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:2187–2198.
83. Harland D, Gardiner SM, Bennett T. Differential cardiovascular effects of centrally administered vasopressin in conscious Long Evans and Brattleboro rats. *Circ Res.* 1989;65:925-33.
84. Haselton JR, Vari RC. Neuronal cell bodies in paraventricular nucleus affect renal hemodynamics and excretion via the renal nerves. *Am J Physiol.* 1998;275:R1334-42.
85. Hasser EM, Bishop VS. Reflex effect of vasopressin after blockade of V1 receptors in the area postrema. *Circ Res.* 1990;67:265-71.
86. Hasser EM, Bishop VS, Hay M. Interactions between vasopressin and baroreflex control of the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24:102-8.
87. Heinrichs M, Domes G. Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. *Prog Brain Res.* 2008;170:337-50.
88. Heller H, editor, *The Neurohypophysis.* New York: Academic Press Inc.;1957.
89. Henry JL, Sessle BJ. Vasopressin and oxytocin express excitatory effects on respiratory and respiration-related neurones in the nuclei of the tractus solitarius in the cat. *Brain Res.* 1989;491(1):150-5.
90. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):78-84.
91. Hernando F, Shoots O, Loalit SJ, Burbach JP. Immunohistochemical localiyation 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.
92. Hirasawa A, Hashimoto K, Tsujimoto G. Distribution and developmental change of vasopressin V1a and V2 receptor mRNA in rats. *Eur J Pharmacol* 1994;267:71-75.

93. Hiroyama M, Aoyagi T, Fujiwara Y, Oshikawa S, Sanbe A, Endo F, Tanoue A. Hyperammonaemia in V1a vasopressin receptor knockout mice caused by the promoted proteolysis and reduced intrahepatic blood volume. *J Physiol.* 2007;581:1183-92.
94. Hirsch JA, Bishop B. Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate. *Am. J. Physiol.* 1981;241:H620-9.
95. 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;84:418-26.
96. Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, Mosovich S. Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:193–198.
97. Hollander E, Bartz J, Chaplin W, Phillips A, Sumner J, Soorya L, Anagnostou E, Wasserman S. Oxytocin increases retention of social cognition in autism. *Biol Psychiatry* 2007;61:498–503.
98. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest.* 2001;120(3):989-1002.
99. Horiba N, Suda T, Aiba M, Naruse M, Nomura K, Imamura M, Demura H. Lysine vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(8):2336-41.
100. Hosoya Y, Sugiura Y, Okado N, Loewy AD, Kohno K. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Exp Brain Res.* 1991;85(1):10-20.
101. Hue L, Van Schaftingen E, Blackmore PF. Stimulation of glycolysis and accumulation of a stimulator of phosphofructokinase in hepatocytes incubated with vasopressin. *Biochem J.* 1981;194:1023-6.
102. Hyndman BW. The role of rhythms in homeostasis. *Kybernetik.* 1974;15:227-36.
103. Imai Y, Abe K, Sasaki S, Minami N, Munakata M, Sakuma H, Hashimoto J, Nobunaga T, Sekino H, Yoshinaga K. Cardiovascular depression and stabilization by central vasopressin in rats. *Hypertension.* 1990;15:291-300.

104. Inaba S, Hatakeyama H, Taniguchi N, Miyamori I. The property of a novel v2 receptor mutant in a patient with nephrogenic diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):381-5.
105. Innamorati G, Sadeghi H, Birnbaumer M. A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. *Mol Pharmacol* 1996;50:467-473.
106. Ivell R, Kimura T, Muller D, Augustin K, bend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillman G. The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Experimental Physiol* 2001;86:289-96.
107. Jankowski M, Wang D, Hajjar F, Mukaddam-Dahler S, McCann SM, Gutkowska, J. Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:6207-6211.
108. 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.
109. Japundžić 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(2):91-100.
110. Japundžić-Žigon N, Todorović Z, Samardžić R, Prostran M. Physostigmine on the short-term systolic blood pressure and heart rate variability in hemorrhagic shock. *Fundam Clin Pharmacol.* 1995;9:Abstract p300.
111. Japundžić-Žigon N. Physiological mechanisms in regulation of blood pressure fast frequency variations. *Clin Exp Hypertens.* 1998;20:359-88. Review.
112. Japundžić-Žigon N. Effects of nonpeptide V1a and V2 antagonists on blood pressure fast oscillations in conscious rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 2001;23:277-92.
113. Japundžić-Zigon N. An update on blood pressure short-term variability. *ScientificWorldJournal.* 2002;2:320-3.
114. Jedema HP, Grace AA. Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. *J Neurosci.* 2004;24:9703-13.

115. Jie G, Natchin Yu V. Evolutionary advantages of participation of vasopressin instead of vasotocin in regulation of water-salt balance in mammals *J Evol Biochem Physiol.* 2004;40:207-12.
116. Kasting NW. Criteria for establishing a physiological role for brain peptides. A case in point: the role of vasopressin in thermoregulation during fever and antipyresis. *Brain Res Rev* 1989;14:143-153.
117. Kato Y, Igarashi N, Hirasawa A, Tsujimoto G, Kobayashi M. Distribution and developmental changes in vasopressin V2 receptor mRNA in rat brain. *Differentiation.* 1995;59:163-9.
118. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Günther G, Rosenthal W, Vischer UM. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest.* 2000;106:107-116.
119. Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost.* 2003;4:682-9.
120. Kc P, Haxhiu MA, Tolentino-Silva FP, Wu M, Trouth CO, Mack SO. Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;133(1-2):75-88.
121. Kc P, Balan, KV, Tjoe, SS, Martin, RJ, Lamanna JC, Haxhiu MA, Dick TE. Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. *J Physiol.* 2010;588:725-740.
122. Kc P, Dick TE. Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012;174:55-64.
123. Kimura T, Yokoyama R. A comparison of patterns of changes in urine flow and urine electrical conductivity induced by exogenous ADH in hydrated rats. *Tohoku J Exp Med.* 1973;109:281-96.
124. Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature.* 1992;356:526-9.
125. Kitney RI. An analysis of the nonlinear behaviour of the human thermal vasomotor control system. *J Theor Biol.* 1975;52:231-48.

126. Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005;435(7042):673-6.
127. Koshimizu TA, Nasa Y, Tanoue A, Oikawa R, Kawahara Y, Kiyono Y, Adachi T, Tanaka T, Kuwaki T, Mori T, Takeo S, Okamura H, Tsujimoto G. V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:7807-12.
128. Kuo J, Hariri OR, Micevych P. An interaction of oxytocin receptors with metabotropic glutamate receptors in hypothalamic astrocytes. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(12):1001-6.
129. Lacroix A, Tremblay J, Touyz RM, Deng LY, Lariviere R, Cusson JR, Schiffrin EL. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2414-22.
130. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 2004;25:150-176.
131. Laude D, Goldman M, Escorrou P, Elghozi JL. Effect of breathing pattern on blood pressure and heart rate oscillations in humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1993;20:619-626.
132. Le Mevel JC, Pamantung TF, Mabin D, Vaudry H. Effects of central and peripheral administration of arginine vasotocin and related neuropeptides on blood pressure and heart rate in the conscious trout. *Brain Res*. 1993;610(1):82-9.
133. Lee HJ, Macbeth AH, Pagani J, Scott Young 3rd W. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol*. 2009;88:127-51.
134. Legros JJ. Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:649-655.
135. Leng G, Ludwig M. Neurotransmitters and peptides: whispered secrets and public announcements. Review. *J Physiol*. 2008;586:5625-32.

136. Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Weller A. Oxytocin during pregnancy and early postpartum: individual patterns and maternal-fetal attachment. *Peptides* 2007;28:1162–1169.
137. Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ. Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature*. 1992;357:336-9.
138. Lowes VL, McLean LE, Kasting NW, Ferguson AV. Cardiovascular consequences of microinjection of vasopressin and angiotensin II in the area postrema. *Am J Physiol*. 1993;265:R625-31.
139. Ludwig, M.; Leng, G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nature* 2006;7:126-136.
140. Luiten PG, ter Horst GJ, Karst H, Steffens AB. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res*. 1985;329(1-2):374-8.
141. Luk J, Ajaelo I, Wong V, Wong J, Chang D, Chou L, Reid IA. Role of V1 receptors in the action of vasopressin on the baroreflex control of heart rate. *Am J Physiol*. 1993;265:R524-9.
142. MacDonald K, Feifel D. Oxytocin in schizophrenia: a review of evidence for its therapeutic effects. *Acta Neuropsychiatrica* 2012:130–146.
143. Malliani A. "Central command" and sympathetic activation. *Funct Neurol*. 1987;2(4):439-44.
144. Mancia G, Parati G, Castiglioni P, di Rienzo M. Effect of sinoaortic denervation on frequency-domain estimates of baroreflex sensitivity in conscious cats. *Am J Physiol*. 1999;276:H1987-93.
145. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio A. 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet*. 1977;1(8017):869-72.
146. Mezzacappa ES, Katlin ES. Breast-feeding is associated with reduced perceived stress and negative mood in mothers. *Health Psychol* 2002;21:187–193.

- 147Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan C. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 1998;12:3264-3275.
- 147b. Milutinović S, Murphy D, Japundzić-Zigon N. The role of central vasopressin receptors in the modulation of autonomic cardiovascular controls: a spectral analysis study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 ;291(6):R1579-91.
- 148Mraovitch S, Kumada M, Reis DJ. Role of the nucleus parabrachialis in cardiovascular regulation in cat. *Brain Res.* 1982;232(1):57-75.
- 149Nakayama Y, Takano Y, Eguchi K, Migita K, Saito R, Tsujimoto G, Kamiya H. Modulation of the arterial baroreceptor reflex by the vasopressin receptor in the area postrema of the hypertensive rats. *Neurosci Lett.* 1997;226:179-82.
- 150Nalbandov AV. Hormonal activities of the pars distalis in reptiles and birds In: Harris GW, Donovan BT. *The Pituitary Gland.* Los Angeles: University of California Press, Berkeley; 1966. p. 295-317.
- 151Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 2002;82(1):205-44.
- 152Noguchi T, Makino S, Matsumoto R, Nakayama S, Nishiyama M, Terada Y, Hashimoto K. Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology* 2010;151:4344-4355.
- 153Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol.* 2006;101:545-8.
- 154North WG, Fay MJ, Longo KA, Du J. Expression of all known vasopressin receptor subtypes by small cell tumors implies a multifaceted role for this neuropeptide. *Cancer Res.* 1998;58(9):1866-71.
- 155O'Donoghue TL, Resta TC, Walker BR. Laboratory demonstration of baroreflex control of heart rate in conscious rats. *Adv Physiol Educ.* 2002;26:309-16.
- 156Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS, Hruby VJ, Stricker EM, Verbalis JG. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 1991;12:113-118.



- 157Ostrowski NL, Lolait SJ,Bradley DJ,O'Carroll AM, Brownstein MJ, Young WS. Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology* 1992;131: 533-535.
- 158Ostrowski NL, Lolait SJ i Young WS 3rd. Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* 1994;135:1511-1528.
- 159Parati G, Saul JP, Di Rienzo M, Mancia G.Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension*. 1995;25(6):1276-86.
- 160Paxinos G, Watson C. The rat brain stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier;2005.
- 161Payet N, Isler H. Adrenal glomerulosa mitotic stimulation by posterior pituitary hormones. *Cell Tissue Res*. 1976;172(1):93-101
- 162Perraudin V, Delarue C, De Keyzer Y, Bertagna X, Kuhn JM, Contesse V, Clauser E, Vaudry H. Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(9):2661-7.
- 163Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR, Nafz B. Endothelium-derived NO stimulates pressure-dependent renin release in conscious dogs. *Am J Physiol*. 1993;264(6 Pt 2):F943-7
- 164Petersen MB. The effect of vasopressin and related compounds at V1a and v2 receptors in animal models relevant to human disease. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006;99:96-103.
- 165Pierzynski P. Oxytocin and vasopressin V(1A) receptors as new therapeutic targets in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(1):9-16.
- 166Pinnock SB, Herbert J. Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress. *Eur J Neurosci*. 2001;13(3):576-84.
- 167.Pittman QJ, Malkinson TJ, Kasting NW, Veale WL. Enhanced fever following castration: possible involvement of brain arginine vasopressin. *Am J Physiol* 1988;254:R513–R517.

168. Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*. 2008;14:182-94.
169. Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA, Swaab DF. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53:137–143.
170. Pyner S, Coote JH. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. *Neuroscience*. 2000;100(3):549-56.
171. Qiu J, Yao S, Hindmarch C, Antunes V, Paton J, Murphy D. Transcription factor expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the dehydrated rat: upregulation of gonadotrophin inducible transcription factor 1 mRNA is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *J Neurosci*. 2007;27:2196-203.
172. 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(2):164-72.
173. Robinson DA, Wei F, Wang GD, Li P, Kim SJ, Vogt SK, Muglia LJ, Zhuo M. Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *The Journal of physiology* 2002;540:593–606.
174. Rosenfeld AJ, Lieberman JA, Jarskog LF. Oxytocin, Dopamine, and the Amygdala: A Neurofunctional Model of Social Cognitive Deficits in Schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2011;37:1077-87.
175. Rossi NF, Chen H. PVN lesions prevent the endothelin 1-induced increase in arterial pressure and vasopressin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2001;280:E349-E356.
176. Rousseau-Merck MF, Rene P, Derre J, Bienvenu T, Berger R, de Keyser Y. Chromosomal localization of the human V3 pituitary vasopressin receptor gene (AVPR3) to 1q32. *Genomics* 1995;30:405-6.
177. Russ RD, Walker BR. Role of nitric oxide in vasopressinergic pulmonary vasodilatation. *Am J Physiol*. 1992;262:H743-7.

- 178.Rzasa J, Ewy Z. Effect of vasotocin and oxytocin on intrauterine pressure in the hen. *J.Reprod.Fert.* 1971;25:115-16.
- 179.Sampey DB, Burrell LM, Widdop RE. Vasopressin V2 receptor enhances gain of baroreflex in conscious spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1999;276:R872-R879.
- 180.Saper CB. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:433-69. Review.
- 181.Saul JP, Berger RD, Albrecht P, Stein SP, Chen MH, Cohen RJ. Transfer function analysis of the circulation: unique insights into cardiovascular regulation. *Am J Physiol.* 1991;261(4 Pt 2):H1231-45.
- 182.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;260:10236-41.
- 183.Savaskan E, Ehrhardt R, Schulz A, Walter M, Schächinger H. Post-learning intranasal oxytocin modulates human memory for facial identity. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33(3):368-74.
- 184.Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL, Kovács KJ.The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res.* 1996;107:201-22.
- 185.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.
- 186.Schneider EG. Effect of vasopressin on adrenal steroidogenesis. *Am J Physiol.* 1988;255:R806-11.
- 187.Serradeil-Le Gal, Wagnon J, Tonnere B, Roux R, Garcia G, Griebel G, Aulombard A. 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.
- 188.Sharma RM, Setlur R Vasopressin in hemorrhagic shock. *Anesth Analg.* 2005;101:833-4.

189. Simmons CF Jr, Clancy TE, Quan R, Knoll JH. The oxytocin receptor gene (OXTR) localizes to human chromosome 3p25 by fluorescence in situ hybridization and PCR analysis of somatic cell hybrids. *Genomics*. 1995;26(3):623-5.
190. Stadlbauer KH, Wagner-Berger HG, Krismer AC, Voelckel WG, Konigsrainer A, Lindner KH, Wenzel V. Vasopressin improves survival in a porcine model of abdominal vascular injury. *Crit Care*. 2007;11(4):R81.
191. Stemmelin J, Luković L, Salome N, Griebel G. Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:35-42.
192. Strack, AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervations of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection. *Brain Res*. 1989;491:156-162.
193. Sugimoto T, Saito M, Mochizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *Biol Chem*. 1994;269:27088-92.
194. Swanson LW, McKellar S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *Comp Neurol*. 1979;188:87-106
195. Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*. 1980;31:410-7.
196. Swerdlow NR, Light GA, Cadenhead KS, Sprock J, Hsieh MH, Braff DL. Startle gating deficits in a large cohort of patients with schizophrenia: relationship to medications, symptoms, neurocognition, and level of function. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:1325–1335.
197. Syarmiento JM, Añazco CC, Campos DM, Prado GN, Navarro J, González CB. Novel down-regulatory mechanism of the surface expression of the vasopressin V2 receptor by an alternative splice receptor variant. *J Biol Chem*. 2004;279(45):47017-23.
198. Tahara A, Tsukada J, Ishii N, Tomura Y, Wada K, Kusayama T, Yatsu T, Uchida W, Tanaka A. Characterization of rodent liver and kidney AVP receptors: pharmacologic evidence for species differences. *Regul Pept*. 1999;84(1-3):13-9.

199. Ter Horst GJ, Luiten PG. Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. *Brain Res Bull.* 1987;18(2):191-203.
200. Thibonnier M, Bert-Mattera LN, Dulin N, Conarty DM, Mattera R. Signal transduction pathways of the human V1-vascular V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog Brain Res* 1998;119:147-161.
201. Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M. The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:175-202.
202. Toyoda F, Yamamoto K, Ito Y, Tanaka S, Yamashita M, Kikuyama S. Involvement of arginine vasotocin in reproductive events in the male newt *Cynops pyrrhogaster*. *Horm Behav.* 2003;44:346-53.
203. Trejter M, Carraro G, Rucinski M, Hochol A, Rebuffat P, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. Arginine-vasopressin regulates proliferative activity of the regenerating rat adrenal cortex. *Int J Mol Med.* 2005;15(6):993-7.
204. Undesser KP, Hasser EM, Haywood JR, Johnson AK, Bishop VS. Interactions of vasopressin with area postrema in arterial baroreflex function in conscious rabbits. *Circ Res.* 1985;56:410-417.
205. Unger T, Rohmeiss P, Demmert G, Ganten D, Lang RE, Luft FC. Differential modulation of the baroreceptor reflex by brain and plasma vasopressin. *Hypertension.* 1986;8:III157-62.
206. Vargas KJ, Sarmiento JM, Ehrenfeld P, Añazco CC, Villanueva CI, Carmona PL, Brenet M, Navarro J, Müller-Esterl W, González CB. Postnatal expression of V2 vasopressin receptor splice variants in the rat cerebellum. *Differentiation.* 2009;77:377.
207. Vliegthart JF, Versteeg DH. The evolution of the vertebrate neurohypophysial hormones in relation to the genetic code. *J Endocrinol.* 1967;38(1):3-12.
208. Warne JM, Balment RJ. Changes in plasma arginine vasotocin (AVT) concentration and dorsal aortic blood pressure following AVT injection in the teleost *Platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol.* 1997;105(3):358-64

209. Warne JM, Harding KE, Balment RJ. Neurohypophysial hormones and renal function in fish and mammals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;132:231-7.
210. Warne JM, Hazon N, Rankin JC, Balment RJ. A radioimmunoassay for the determination of arginine vasotocin (AVT): plasma and pituitary concentrations in fresh- and seawater fish. *Gen Comp Endocrinol.* 1994;96:438-44.
211. Willette RN, Punnen-Grandy S, Krieger AJ, Sapru HN. Differential regulation of regional vascular resistance by the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. *J Auton Nerv Syst.* 1987;18(2):143-51.
212. Wu G, Hu G, Shen L, Tang D, Lu L, Li P. The measurement of baroreflex sensitivity in stress-induced hypertensive rats by spectral analysis. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 1998;15:234-8.
213. [www.blass.com.au/definitions](http://www.blass.com.au/definitions); 8.03.2011.
214. Yang J, Chen JM, Song CY, Liu WY, Wang G, Wang CH, Lin BC. Through the central V2, not V1 receptors influencing the endogenous opiate peptide system, arginine vasopressin, not oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus involves in the antinociception in the rat. *Brain Res.* 2006;1069(1):127-38.
215. Yang J, Yang Y, Xu HT, Chen JM, Liu WY, Lin BC. Arginine vasopressin induces periaqueductal gray release of enkephalin and endorphin relating to pain modulation in the rat. *Regul Pept.* 2007;142(1-2):29-36.
216. Yibchok-anun S, Hsu WH. Effects of arginine vasopressin and oxytocin on glucagon release from clonal alpha-cell line In-R1-G9: involvement of V1b receptors. *Life Sci.* 1998;63(21):1871-8.
217. Yoo JH, Park C, Hahm DH, Lee HJ, Park HM. Determination of optimal dose of arginine vasopressin in hemorrhagic shock in dogs. *J Vet Med Sci.* 2007;69:755-8.
218. Young WS 3rd, Gainer H. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology.* 2003;78:185-203.
219. Zink CF, Stein JL, Kempf L, Hakimi S, Meyer-Lindenberg A. Vasopressin modulates medial prefrontal cortex-amygdala circuitry during emotion processing in humans. *J Neurosci.* 2010;30(20):7017-22.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Сања Милутиновић - Смиљанић  
број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога централних  $V_2$  вазопресинских рецептора у кардиоваскуларној хомеостази

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

### Потпис докторанда

У Београду, 28.03.2013.год.

Сања Милутиновић  
- Смиљанић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Милутиновић -Смиљанић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада: Улога централних В2 вазопресинских рецептора у  
кардиоваскуларној хомеостази

Ментор: проф. др Нина Жигон

Потписана Сања Милутиновић - Смиљанић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 13.09.2012.год.

Сања Милутиновић  
- Смиљанић



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Улога централних В2 вазопресинских рецептора у кардиоваскуларној хомеостази која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 28.03.2013.год.

*Сава Мунчиновић*  
\_\_\_\_\_  
*- Стубанет*

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

## Biografija

Sanja Milutinović-Smiljanić rođena je 21.01.1973. god. u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu (prosečna ocena 8,11) 2000. god. u Beogradu. Obavezni lekarski staž odradila je u KBC Zvezdara i položila stručni ispit (2001.god.).

Magistarsku tezu pod nazivom “Centralna holinergička modulacija brzih oscilacija krvnog pritiska” pod mentorstvom prof. dr Nine Žigon. odbranila je 13.12.2007. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Usavršavala se u SAD, na Medicinskom fakultetu Univerziteta Illinois u Čikagu, u laboratoriji prof. John R. Solara (2003.god.) i u laboratoriji prof. Davida Murpheyja na Univerzitetu u Bristolu, u Velikoj Britaniji (2004.god.)

Po povratku u Beograd Milutinović-Smiljanić radila je kao istraživač pripravnik u okviru tri projekta: OI 1774 MNTR (2001-2005), Wellcome Trust projekta (2004-2007) i OI 145062 MNTR (2005-2010) čiji je rukovodilac bila prof. dr Nina Žigon. Od decembra 2008.god. zaposlena je kao asistent na predmetu Opšta i oralna histologija i embriologija Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i uključena u projekat III41013 Ministarstva nauke i prosvete (2010-2013) čiji je rukovodilac prof.dr Nina Žigon.

Do sada je objavila sedam radova u celini u časopisima indeksiranim na SCI i CC listi (6M21 i 1 M23), sedam radova štampanih u celini na međunarodnim kongresima, devet sažetaka u zbornicima sa međunarodnih kongresa i šest radova štampanih u celini u zbornicima/časopisima sa nacionalnih skupova.

U Beogradu, 28.3.2013.god.

Sanja Milutinović-Smiljanić

## Objavljeni radovi koji čine, ili su povezani sa doktorskom disertacijom

### 1. M21; IF 4,409

Milutinović-Smiljanić S, Šarenac O, Lozić-Đurić M, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Evidence for involvement of central vasopressin V1b- and V2- receptors in stress-induced baroreflex desensitization. *Br J Pharmacol* 2013,doi:10.1111/bph.12161.

### 2. M21; IF 3.909

Stojičić S, Milutinović-Smiljanić S, Šarenac O, Milosavljević, S, Paton JFR, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Blockade of central vasopressin reduces the cardiovascular response to acute stress in freely moving rats. *Neuropharmacology* 2008;54(5):824-36

### 3. M21; IF 3.802

Milutinović S, Murphy D, Japundžić-Žigon N. The role of central vasopressin receptors in the modulation of autonomic cardiovascular controls: a spectral analysis study. *Am. J. Physiology – Regulatory Integrative Comparative Physiology* 2006;291:1579-1591.

### 4. M23; IF 0.889

Stojičić S, Milutinović S, Šarenac O, Živković S, Japundžić-Žigon N. Central vasopressin V<sub>1a</sub> and V<sub>1b</sub> receptors modulate the cardiovascular response to air-jet stress in conscious rats. *Biomed. Tech.* 2006;4:268-71.