

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Mirjana S. Jovanović

NEUROKARDIOGENA ADAPTACIJA NA  
TRUDNOĆU U HRONIČNOJ HIPERTENZIJU

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Mirjana S. Jovanović

NEUROCARDIOGENIC ADJUSTMENT TO  
CHRONIC HYPERTENSIVE PREGNANCY

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024

**Mentor:**

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

Komentor: Naučni saradnik dr sci. Bojana Stevanović, OJ Institutski predmeti, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

1. Prof. dr Jelena Nešović-Ostojić, redovni profesor, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Svetolik Spasić, docent, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Bajić, Naučni savetnik, Katedra za telekomunikacije i obradu signala, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Konstantinu, Maksimu i Petri.*

*Zahvaljujem se koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:*

- 1. Kreiranju koncepta teze: prof. dr Nina Japundžić-Žigon*
- 2. Prikupljanju podataka: dr sci. Bojana Stevanović, asist. dr Vladislav Pajović*
- 3. Formalnoj analizi: dr sci. Bojana Stevanović, asist. dr Vladislav Pajović*
- 4. Metodologiji: dr sci. Bojana Stevanović, asist. dr Vladislav Pajović, asist. dr Tatjana Tasić, dr Maja Lozić, doc. dr Ljiljana Đukić, asist. dr Marija Kosić;*
- 5. Statističkoj analizi: asist. dr Vladislav Pajović;*
- 6. Superviziji: prof. dr Nina Japundžić-Žigon, dr sci. Bojana Stevanović*
- 7. Pisanje – originalni nacrt: prof. dr Nina Japundžić-Žigon*
- 8. Pisanje – recenzija i uređivanje: prof. dr Nina Japundžić-Žigon, dr sci. Bojana Stevanović, prof. dr David Murphy*

# NEUROKARDIOGENA ADAPTACIJA NA TRUDNOĆU U HRONIČNOJ HIPERTENZIJU

## REZIME

Adaptacija kardiovaskularnog sistema (KVS) na trudnoću podrazumeva niz hemodinamskih promena izazvanih remodelovanjem perifernih i centralnih mehanizama. Pad krvnog pritiska (BP) u trudnoći aktivira barorefleks, koji povećava tonus simpatikusa ka KVS i sintezu i lučenje vazopresina (VP). Poznato je da VP ima ulogu u adaptaciji na normotenzivnu trudnoću, ali i u razvoju primarne hipertenzije. Ipak, uticaj VP-a na neuroendokrinu i autonomnu adaptaciju KVS tokom hronično hipertenzivne trudnoće nije dovoljno istražen. Ova studija je izvedena na ženama normotenzivnih Wistar (WR) i spontano hipertenzivnih pacova (SHR) sa ugrađenim radiotelemetrijskim uređajem za kontinuirano hemodinamsko merenje. Spektralnom analizom je procenjena varijabilnost BP-a i srčane frekvencije (HR), a osetljivosti barorefleksa (BRS) primenom metode sekvence. Koncentracija VP-a u plazmi je određena ELISA testom, a ekspresija gena VP, V1aR i V1bR, RT-qPCR metodom. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da negravidne SHR ženke imaju veću ekspresiju gena za VP, V1aR i V1bR u PVN-u i SON-u u odnosu na WR ženke u diestrusu. Gravidne SHR ženke imaju smanjenu ekspresiju VP-a u SON-u, niži VP u plazmi i normalan BP tokom kasne trudnoće, ali i znake pojačane simpatičke srčane stimulacije (porast HR i LF-HR), kao i angažovanje vagalnih mehanizama (uvećanje BRS-a i HF-HR). Kod WR ženki kasna trudnoća je podstakla povišenu ekspresiju gena za VP u PVN-u i SON-u, dok je pad nivoa VP-a u plazmi i BP-a manje izražen nego kod SHR-ova, a značajne promene parametara autonomne kontrole su izostale. Ovi rezultati ukazuju na postojanje razlika u neurokardiogenoj adaptaciji na trudnoću između ženki WR-a i SHR-ova.

**Ključne reči:** trudnoća, hronična hipertenzija, vazopresin, vazopresinski receptori, osetljivost barorefleksa, kardiovaskularni varijabilitet, paraventrikularno jedro, supraoptičko jedro

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Fiziološke nauke

**UDK br.**

# NEUROCARDIOGENIC ADJUSTMENT TO CHRONIC HYPERTENSIVE PREGNANCY

## SUMMARY

Cardiovascular system (CVS) adjustment to pregnancy encompasses numerous hemodynamic changes induced by the remodeling of peripheral and central mechanisms. During pregnancy, arterial blood pressure drop activates the baroreflex, which increases sympathetic tone towards the CVS, and the synthesis and secretion of vasopressin (VP). It is known that VP is involved both in adaptation to normotensive pregnancy as well as in development of primary hypertension. Yet, the impact of VP to the neuroendocrine and autonomic adaptations of the CVS to chronic hypertensive pregnancy is not fully investigated. This study was performed on female normotensive Wistar (WRs) and Spontaneously hypertensive rats (SHRs), equipped with a radiotelemetry device for continuous hemodynamic recording. Variability of blood pressure (BP) and heart rate (HR) was estimated by spectral analysis, while baroreceptor reflex sensitivity (BRS) was evaluated using the sequence method. Plasma VP was determined by ELISA whereas VP, V1aR, and V1bR gene expression was detected by RT-qPCR. Our results show that non-pregnant SHRs exhibit greater VP, V1aR and V1bR gene expression in both PVN and SON compared to Wistar diestrus females. Pregnant SHR dams display reduced expression of VP in SON, lower plasma VP and normal BP during late pregnancy, as well as marked signs of enhanced sympathetic cardiac stimulation (increased HR and LF-HR variability) and recruitment of vagal mechanisms (enhanced BRS and HF-HR variability). In WR females, late pregnancy increased VP gene expression both in the PVN and SON, while the drop of plasma VP levels and BP were less pronounced compared to SHRs and no significant changes in autonomic control parameters were present. These results suggest a differential neurocardiogenic adaptation to pregnancy in WR and SHR females.

**Key words:** pregnancy, chronic hypertension, vasopressin, vasopressin receptors, baroreflex sensitivity, cardiovascular variability, paraventricular nucleus, supraoptic nucleus

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Physiological sciences

**UDK No.**

## 1. UVOD

### 1.1. Trudnoća

Trudnoća (gestacija, lat. *graviditas*) predstavlja vremenski period tokom kojeg se, u organizmu žene, razvija plod. Nastaje oplođenjem jajne ćelije, nakon čega nastupa period intenzivnih ćelijskih procesa – razviće, a završava se potpunom ekspulzijom ploda i plodovih ovojaka u spoljašnju sredinu (Soma-Pillay i sar, 2016). Tokom trudnoće, organizam majke prolazi kroz značajne morfo – funkcionalne promene u cilju adaptacije na plod koji se razvija i raste. Ove promene započinju neposredno po začeću, utiču na svaki organski sistem i nakon porođaja, kod većine nekomplikovanih trudnoća, postepeno iščezavaju tako da se organizam vraća u pređašnje stanje. Navedene promene i mehanizme adaptacije je važno razumeti zbog toga što usled minimalnih odstupanja od novodefinisanih baždarnih tačaka homeostatskih varijabli može doći do razvoja patoloških stanja i komplikacija koje mogu uticati na preživljavanje ploda ili majke ili pak značajno izmeniti kvalitet njihovog života (Davis i Narayan 2020).

### 1.2. Kardiovaskularno remodelovanje u trudnoći

Adaptivni mehanizmi u okviru kardiovaskularnog sistema u trudnoći podrazumevaju perifernu vazodilataciju sa padom ukupnog perifernog otpora i sledstvenim padom arterijskog krvnog pritiska (Sanghavi i Rutherford 2014). Javljaju se i posledične promene u funkcionisanju srca koje uključuju povećanje srčane frekvence, udarnog i minutnog volumena i smanjenje perifernog vaskularnog otpora. Na morfološkom planu najistaknutije promene su uvećanje mase ventrikularnog zida, kontraktilnosti miokarda i srčane komplijanse (Klein i Pich 2003).

Jedan od karakterističnih adaptivnih mehanizama u trudnoći je sistemska vazodilatacija, sa istaknutim efektima u bubrežnoj cirkulaciji. Sistemska vazodilatacija se uočava već od 5. nedelje trudnoće, pre potpunog razvoja placente i uteroplacentarne cirkulacije (Chapman i sar, 1998). Primećene su varijacije u navedenom fenomenu gde u toku prvog trimestra dolazi do značajnog smanjenja perifernog vaskularnog otpora, sa minimumom tokom sredine drugog trimestra, i naknadnom stabilizacijom ili blagim povećanjem do kraja trudnoće. Smanjenje perifernog vaskularnog otpora iznosi od 35% do 40% u odnosu na početne vrednosti, sa primećenim trendom normalizacije dve nedelje po porođaju (Clapp i Capeless 1997). Hiperemične promene u bubrezima usled sistemske vazodilatacije dovode do povećanja renalnog protoka krvi do 50 % i brzine glomerularne filtracije što, posledično rezultira smanjenjem vrednosti serumskog kreatinina, uree i mokraćne kiseline (Cheung i Lafayette 2013).

U toku trudnoće, dolazi do povećanja debljine i mase zida leve komore za čak 50 % u odnosu na vrednosti pre trudnoće (Umazume i sar, 2018). Leva polovina srca radi pod povećanim volumenskim opterećenjem u cilju obezbeđivanja adekvatnog minutnog volumena. Pojačana funkcija levog srca dovodi do koncentrične hipertrofije kardiomiocita i posledičnog



uvećanja zida leve komore. Međutim, prema rezultatima jedne studije gde su trudnice podvrgnute kardijalnoj magnetnoj rezonanci, verifikovano je i postojanje hipertrofije desne polovine srca, sa uvećanjem od čak 40% (Ducas i sar, 2014).

U gestaciji raste i minutni volumen srca. Najveći porast se beleži početkom prvog i nastavlja tokom drugog trimestra. U trećem trimestru su primećeni oprečni rezultati u pogledu promena minutnog volumena koji može da raste, opada ili da se stabilizuje. Minutni volumen srca raste rano u gestaciji kao posledica povećanja udarnog volumena, dok je njegovo kasnije uvećanje posledica porasta srčane frekvencije. Udarni volumen postepeno raste tokom trudnoće do kraja drugog trimestra, a zatim ostaje konstantan ili se smanjuje kasno u trudnoći (Hunter i Robson 1992).

Trudnoća dovodi do smanjenja arterijskih krvnih pritisaka (engl. *Blood pressure* - BP) i to: sistolnog, dijastolnog, srednjeg arterijskog i centralnog. Arterijski pritisci postepeno opadaju do drugog trimestra gde se uočava smanjenje za 5-10 mmHg ispod prosečnih vrednosti, sa najistaknutijim promenama još na početku trudnoće, u poređenju sa vrednostima pre trudnoće. Arterijski pritisci počinju da se povećavaju tokom trećeg trimestra i nakon porođaja vraćaju se na vrednosti pre trudnoće. (Mahendru i sar, 2014).

Frekvenca srca se povećava tokom normalne gestacije. Za razliku od prethodnih parametara koji dostižu maksimalne promene tokom drugog trimestra, frekvencija srca se postepeno povećava tokom cele trudnoće za 10 - 20 otkucaja u minuti, dostižući najviše vrednosti u trećem trimestru. Ukupno povećanje frekvencije srca u toku trudnoće iznosi 20% do 25% u odnosu na početne vrednosti (Grindheim i sar, 2012).

### 1.3. Neuroendokrino remodelovanje u trudnoći

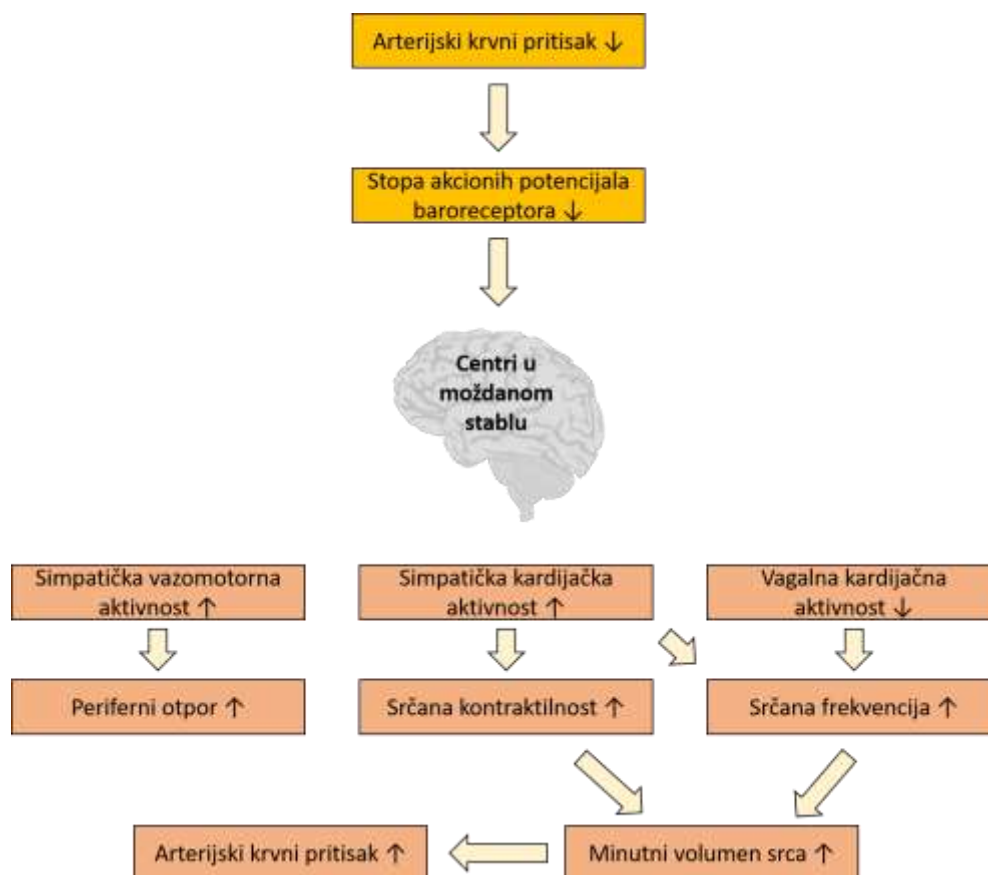
#### 1.3.1. Autonomna adaptacija u trudnoći

U ranom periodu trudnoće, vazomotorna aktivnost simpatičkog sistema je uvećana. Do ovog efekta dolazi zbog povećane osetljivosti baroreceptora i smanjene responsivnosti na  $\alpha$ -adrenergičku stimulaciju. Usled pada arterijskog krvnog pritiska, aktivira se barorefleks, koji povećava tonus simpatikusa prema kardiovaskularnom sistemu (srcu i krvnim sudovima), zbog čega dolazi do ubrzanja srčanog rada, fiziološke hipertrofije srčanog mišića, kao i stimulacije sinteze i lučenja renina, angiotenzina i aldosterona na nivou bubrega i kore nadbubrežnih žlezda (Sanghavi i Rutherford 2014; Tkachenko, Shchekochikhin, i Schrier 2014). I pored toga, u trudnoći simpatička vazokonstrikcija izostaje zbog poremećaja u neurovaskularnoj signalizaciji, smanjenja osetljivosti na vazokonstriktore ( $\alpha$ -agonisti, noradrenalin i angiotenzin II) (Sanghavi i Rutherford 2014) i prekomerne ekspresije vazodilatatornih angiotenzinskih AT-2 receptora u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (Mishra, Gopalakrishnan, i Kumar 2018; Fatima, Patel, i Hussain 2021), što doprinosi dubokoj vazodilataciji (Tkachenko, Shchekochikhin, i Schrier 2014). Dominacija simpatičke regulacije kardiovaskularnog sistema nad parasimpatičkim u trudnoći (Dampney i sar, 2018) je povezana

i sa smanjenjem osetljivosti arterijskog barorefleksa (Molino i sar, 1999), čestom pojavom sinkopa (Molino i sar, 1999; Chatur i sar, 2019) i povećanim rizikom od peripartalne hemoragije sa visokom stopom mortaliteta (Panchal, Arria, i Labhsetwar 2001).

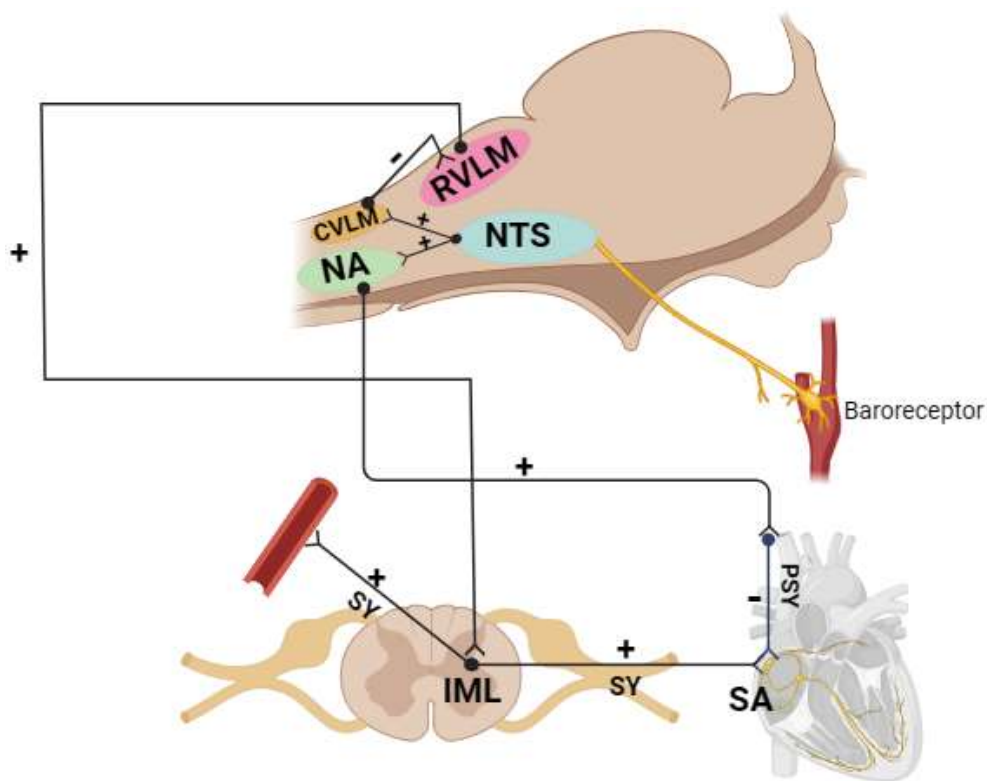
#### 1.3.1.1. Barorefleks u trudnoći

Baroreceptorski refleks (BRR) je važan kardiovaskularni refleks koji funkcioniše po principu negativne povratne sprege i kontroliše BP na kratkoročnom nivou (**Slika 1**). Baroreceptori su tip mehanoreceptora koji prenose informacije o krvnom pritisku unutar autonomnog nervnog sistema. Ove informacije putuju velikom brzinom kako bi se prilagodili ukupni periferni otpor i minutni volumen srca, održavajući krvni pritisak unutar unapred definisanih baždarnih tačaka. Postoje dve vrste baroreceptora: arterijski baroreceptori koji registruju povišen pritisak i kardiopulmonarni receptori koje registruju nizak pritisak, odnosno promenu volumena cirkulišuće tečnosti i aktiviraju se istezanjem zida krvnog suda. Arterijski baroreceptori nalaze se u karotidnim sinusima i luku aorte. Kardiopulmonarni receptori, smešteni su u pretkomorama, komorama i u plućnoj vaskularnoj mreži. Svaka promena pritiska detektovana je od strane baroreceptora, pri čemu informacija putuje ekscitatornim glutaminergičkim aferentnim vlaknima koja čine deo glosofaringealnog nerva (IX kranijalni nerv) i vagusnog nerva (X kranijalni nerv). Ova vlakna se završavaju u *nucleus tractus solitarii* (NTS). Aksoni glutaminergičkih neurona drugog reda iz NTS-a se projektuju do kardijačnih vagalnih motoneurona u *nucleus ambiguus*-u (NA) ili do interneurona u kaudalnoj ventrolateralnoj meduli (CVLM). Iz CVLM-a polaze projekcije neurona koji sadrže gama-aminobuternu kiselinu (GABA) i formiraju sinapse sa simpatičkim premotornim neuronima u rostralnoj ventrolateralnoj meduli (RVLM). Premotorni neuroni RVLM-a su tonično aktivni i ključni za održavanje simpatičkog vazomotornog tonusa i arterijskog pritiska u mirovanju (**Slika 2**) (Al-Khazraji i Shoemaker 2018; Porzionato i sar, 2019; Purkayastha i sar, 2018).



**Slika 1.** Aktivacija BRR kao odgovor na pad arterijskog krvnog pritiska.

Kardiopulmonalni baroreceptori se, kao što je već napomenuto, nalaze u zidovima velikih vena, prektomora i u plućnoj cirkulaciji. Aktiviraju se u stanjima kada se zapremina krvi poveća, pri čemu dolazi do rastezanja zidova vena, pretkomora i plućnih krvnih sudova. Aktivirani baroreceptori šalju aferentne signale kroz nervna vlakna *n. vagus*-a u *Nucleus Tractus Solitarii (NTS)*. U NTS-u, aferentni signali se integrišu i obrađuju odakle se dalje šalju informacije do drugih centara u mozgu, uključujući hipotalamus - u magnocelularna PVN i SON jedra, i druge strukture medule, poput CVLM koji koordiniraju odgovarajuće autonomne odgovore. Aktivacijom kardiopulmonalnih baroreceptora dolazi do inhibicije simpatikusa zbog GABA-ergičkih neurona iz CVLM koji inhibiraju aktivnost RVLM. Ovo rezultira smanjenjem simpatičkog tonusa, vazodilatacijom i smanjenjem srčane frekvencije. Povećana aktivacija parasimpatičkih puteva, kroz stimulaciju vagusnog nerva, rezultira takođe smanjenjem srčane frekvence. Aktivacija ovih baroreceptora povećava i izlučivanje natrijuma i vode putem bubrega, kroz smanjeno oslobađanje VP zbog inhibitornih sinapsi iz NTS-a (Hasser, 1997; Suarez i sar, 2021).



**Slika 2. Šematski prikaz nervnih struktura koje učestvuju u BRR regulaciji BP.** Baroreceptori detektuju promene u krvnom pritisku i šalju signale do *Nucleus Tractus Solitarii* (NTS). NTS prenosi signale do *Nucleus Ambiguus* (NA) i rostralne ventrolateralne medule (RVLM). RVLM aktivira simpatičke neurone (SY) u intermediolateralnom (IML) jedru sive mase kičmene moždine, koji povećavaju srčanu frekvenciju i vaskularni tonus. Kaudalna ventrolateralna medula (CVLM) inhibira RVLM, održavajući ravnotežu simpatičke aktivnosti. PSY - parasimpatička vlakna; SA - sinoatrijalni čvor.

Mehanizmi koji dovode do promene u osetljivosti baroreceptora uključuju integrativno dejstvo različitih moždanih struktura i hormonalnih mehanizama. Trudnoćom izazvana modulacija funkcije barorefleksa se može dogoditi na bilo kojem nivou gore opisanog barorefleksnog puta, iako se RVLM ističe kao ključna struktura (Brooks i sar, 2020).

Jedan od hormonalnih mehanizama trudnoće koji utiče na osetljivost barorefleksa je delovanje metabolita progesterona, 3-alfa hidroksi progesterona (3 $\alpha$ -OH-DHP-a) koji dodatno pojačava GABA-ergičku supresiju RVLM premotornih neurona. Nivoi 3 $\alpha$ -OH-DHP-a, kao i enzimi odgovorni za sintezu 3 $\alpha$ -OH-DHP-a iz progesterona, su povećani u mozgu krajem trudnoće, kada funkcija barorefleksa dostiže svoj minimum. Veza između 3 $\alpha$ -OH-DHP-a i povećanog tonične aktivnosti GABA sistema RVLM-u je pokazana i sposobnošću ovog neurosteroida da se veže za GABA<sub>A</sub> receptore i pojača njihovu funkciju. Tokom trudnoće,

premotorni neuroni RVLM-a su pod povećanom toničnom GABA-ergičkom inhibicijom (Brooks, Dampney, i Heesch 2010).

Insulin je još jedan hormon koji je uključen u promenu osetljivosti barorefleksa u toku trudnoće. Insulinska rezistencija je normalna adaptivna karakteristika trudnoće koja nastaje u cilju povećanja cirkulišućih nivoa glukoze, i njenog transporta kroz placentu. Međutim, postoje dokazi koji upućuju na to da insulinska rezistencija doprinosi smanjenju osetljivosti barorefleksa, zbog redukcije nivoa insulina u mozgu (Daubert, Chung, i Brooks 2007; Brooks, Dampney, i Heesch 2010; Azar i Brooks 2011). Moždani centri i putevi preko kojih insulin utiče na funkciju barorefleksa su nedavno identifikovani. Za razliku od  $3\alpha$ -OH-DHP-a, koji deluje u RVLM-u, insulin inicira svoje efekte u prednjem mozgu. Arkuatni nukleus je identifikovan kao mesto gde insulin aktivira simpatički nervni sistem i utiče na osetljivost barorefleksa putem neuronskih projekcija koje uključuju PVN i SON (Cassaglia i sar, 2011).

### 1.3.2. Renin-angiotenzin-aldosteron sistem

Renin-angiotenzin-aldosteron sistem (RAAS) predstavlja jedan od glavnih hormonskih sistema koji se aktiviraju u trudnoći. Pojačana aktivnost ovog sistema uočava se rano u trudnoći, oko 6 – 8 nedelje, sa povećanjem zapremine plazme i postepeno raste do 28 – 30. nedelje. Tokom trudnoće, porast nivoa estrogena prati rast angiotenzinogena, supstrata renina, što posledično povećava i nivoe angiotenzina. Ova aktivacija održava BP i pomaže održanju bilansa soli i vode u trudnoći, jer funkcioniše u sprezi sa perifernom vazodilatacijom, u okviru koje dolazi do pada BP-a i gubitka soli i vode. Vaskularna neosetljivost na angiotenzin II tokom normalne trudnoće može biti rezultat smanjenja receptora za angiotenzin II, povećane ekspresije vazodilatatornih AT2 receptora, povećanog lučenja progesterona i prostaciklina ili efekta relaksina (Sanghavi i Rutherford 2014; Mishra, Gopalakrishnan, i Kumar 2018; Fatima, Patel, i Hussain 2021).

### 1.3.3. Vazopresin

Vazopresin (poznat još i kao arginin vazopresin – AVP) ili antidiuretski hormon je peptid sastavljen od 9 aminokiselina, koji ima ulogu u održavanju ravnoteže vode i soli i regulaciji BP-a (Boone i Deen 2008).

Na osnovu rezultata nekoliko studija koje su ispitivale ekspresiju VP-a, kod ljudi i neprimatskih organizama, pokazano je da se VP pretežno sintetiše u neuronima supraoptičkog (SON), paraventrikularnog (PVN) jedra hipotalamusa (Barberis i Tribollet 1996). Značajno je istaći da se u okviru SON-a i PVN-a sintetiše u telima magnocelularnih neurona (MCN) koji projektuju svoje duge aksonske produžetke u zadnji režanj hipofize (neurohipofiza), odakle se nakon adekvatnog stimulusa oslobađa direktno u krvotok. S druge strane, VP sintetisan od strane parvocelularnih neurona, koji se karakterišu kratkim aksonskim produžecima, se transportuje u spoljašnju stranu eminencije medijane i reguliše sekreciju hormona prednjeg režnja hipofize (adenohipofiza), sa najistaknutijim efektom na adrenokortikotropni hormon (ACTH) (Wei i sar, 2021). Uz pomoć različitih metoda za vizuelizaciju je pokazano da se VP

može takođe sintetisati i u perifernim organima, poput srca, krvnih sudova, nadbubrežne žlezde, materice itd (Ivanisevic i sar, 1989; Nicholson i sar, 1984). Pored toga, određen je i ekspresioni profil VP-a u kulturama  $\beta$  - ćelija Langerhansovih ostrvaca (Mohan i sar, 2018).

VP deluje putem tri tipa receptora: V1aR, V1bR, i V2R. Navedeni receptori spadaju u familiju receptora kuplovanih sa G proteinom, pri čemu se finalni ishodi aktivacije ogledaju u tipu G subjedinice koja je eksprimirana uz odgovarajući tip receptora. U ćelijama glatkih mišića materice, V1aR Gq subjedinica aktivira fosfolipazu C i MAP kinazu što dovodi do stvaranja inozitol trifosfata (IP3) i 1,2-diacilglicerola (DAG). IP3 dovodi do oslobađanja  $Ca^{2+}$  iz intracelularnih depoa, dok DAG stimuliše protein kinazu C (PKC). U kardiomiocitima i glatkim mišićnim ćelijama, vezivanjem VP-a za isti tip receptora, povećanje  $Ca^{2+}$  aktivira kalcijum/kalmodulin (CaM) zavisne proteinske kinaze, sintaze azot oksida (NOS), MAP kinaze, p38 MAPK i Akt kinaze. Kao posledica aktivacije brojnih signalnih puteva posredstvom V1aR, dolazi do kontrakcije glatke muskulature krvnih sudova i vazokonstrukcije, kao i povećane kontraktilnosti mišića materice (T.A. Koshimizu i sar, 2012). Osim toga angažovanje V1aR u *area postrema* VP-om iz cirkulacije, utiče na aktivnost barorefleksa (Hasser, Bishop, i Hay 1997; T.A. Koshimizu i sar, 2006). Aktivacija V1bR dovodi pokretanja intracelularnih signalnih puteva kao i V1aR. V1bR su manje brojni i eksprimiraju se prvenstveno u hipokampusu, amigdali, hipofizi i pankreasu (Hernando i sar, 2001). Glavni put stimulacije V2R uključuje interakciju sa Gs subjedinicom, koja rezultira aktivacijom adenilat ciklaze, stvaranjem cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), aktivaciju protein kinaze A (PKA) i fosforilaciju akvaporina-2 koji se potom eksprimira na apikalnoj membrane distalnog tubulocita. Kod pacova, miševa i ljudi, vazopresinski V2 receptori (V2R) su pretežno detektovani u bubrezima, na bazolateralnoj membrani debelog uzlaznog kraka Henleove petlje, distalnog savijenog tubula i sabirnim kanalima (E. Szczepanska-Sadowska, Cudnoch-Jedrzejewska, i Wsol 2020; Ewa Szczepanska-Sadowska i sar, 2017).

#### 1.3.3.1. PVN i SON kao izvori VP-a

Paraventrikularno jedro hipotalamusa predstavlja visoko konzerviranu strukturu koja se nalazi u ventralnom delu međumozga sa obe strane treće komore. U sastav ovog jedra ulaze morfološki heterogene populacije parvocelularnih i MCN-a. Funkcionalno PVN je podeljen na neuroendokrini i autonomni deo (Benarroch 2005).

I. U okviru neuroendokrinog dela PVN-a se nalaze se neurosekretorni MCN i parvocelularni neuroni (PCN). MCN koji luče VP i oksitocin (OT) se uglavnom projektuju do zadnjeg režnja hipofize (Brown i sar, 2013). PCN neuroni koji sintetišu VP u manjoj meri se projektuju do eminencije medijane i učestvuju u regulaciju hipotalamo-hipofizno-tiroidne (HHT) i hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) osovine.

II. "Autonomni" deo PVN-a je odgovoran za modulaciju simpatičkog tonusa. Topografski gledano, ovaj deo PVN-a se sastoji od heterogenih populacija ćelija sa različitim morfološkim i fiziološkim karakteristikama. Specifične grupe preautonomnih neurona PVN-a kontrolišu različite simpatičke i parasimpatičke centre u mozgu i kičmenoj moždini, uključujući

intermediolateralni nukleus (IML), *nucleus tractus solitarius* (NTS), dorzalno motorno jedro vagusa (DMV) i rostralnu ventrolateralnu medulu (RVLM). Navedena regulacija simpatičkog tonusa funkcionira kroz tri neuronska kola (Dampney i sar, 2018; Coote i sar, 1998; Coote 2005):

- 1) Direktno kolo - uključuje presimpatičke neurone PVN-a koji se projektuju direktno do simpatičkih preganglijskih neurona (SPN) u IML-u (Nunn i sar, 2011). Ove projekcije su ključne za kardiovaskularnu regulaciju, jer IML predstavlja završnu integrativnu tačku u CNS-u, odakle nervi utiču na krvne sudove, srce, bubrege i srž nadbubrežne žlezde.
- 2) Indirektno kolo - sastoji se od presimpatičkih neurona PVN-a koji se projektuju do RVLM-a, premotornog jedra u mozgu zaduženog za održanje toničke simpatičke aktivnosti. Aksoni RVLM-a se pružaju do SPN-a u torakolumbalnom IML-u, tako indirektno modifikujući simpatički uticaj na kardiovaskularni sistem.
- 3) Dvojno kolo - čini oko 30% neurona PVN-a, koji šalju aksonske projekcije do SPN-a u IML-u i kolaterale do RVLM-a, tako regulišući simpatičku aktivnost direktno i indirektno.

Supraoptičko jedro hipotalamusa predstavlja strukturu lokalizovanu sa obe strane optičke hijazme i sastoji se iz tri dela: *pars principalis*, *pars intraoptica* i *pars tuberalis*. *Pars principalis* sačinjavaju neuroni povezani sa lateralnim granicama optičke hijazme i optičkog trakta, *pars intraoptica* sadrži neurone lokalizovane duž aksona optičke hijazme, a *pars tuberalis* se sastoji od neurona koji su pozicionirani medijalno u odnosu na optičke traktove. U sastav SON-a ulaze MCN koji produkuju VP i oksitocin i pružaju se do neurohipofize. Ulazne projekcije u SON dolaze iz medijalnog preoptičkog, arkuatnog parabrahijalnog jedra ali i iz RVLM-a. (Lopes-Azevedo i sar, 2020; Cunningham, Bohn, i Sawchenko 1990).

### 1.3.3.2. Modulacija aktivnosti MCN

U stanjima gde postoji povećana koncentracija natrijuma u organizmu, bilo usled povišenog unosa ili zadržavanja natrijuma, dolazi do poremećaja osmolalnosti ekstracelularnih tečnosti. Novonastalo hiperosmolarno stanje aktivira homeostatski odgovor PVN-a i SON-a, stimulišući MCN i presimpatičke PCN, rezultirajući porastom koncentracije VP-a u plazmi i povećanjem simpatičkog tonusa ka perifernim organima (Bourque 2008).

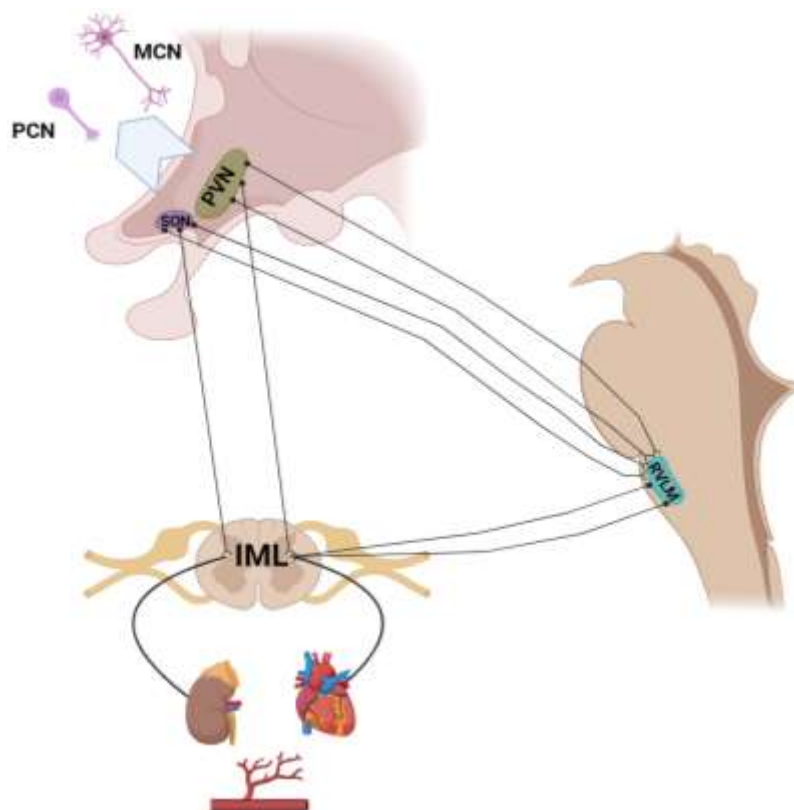
Porast osmolalnosti od samo 1% može stimulisati sintezu VP-a u MCN-u, kao i pojačanu sekreciju VP-a u plazmu. MCN primaju informacije o stanju hidriranosti organizma putem projekcija iz regiona periventrikularne anteroventralne treće komore (AV3V) (Leng i sar, 1989) i cirkumventrikularnih organa- subfornikalnog organa (SFO) i *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), kao i medijalnog preoptičkog jedra (MnPO) (McKinley i sar, 2001; Cunningham i Sawchenko 1991; Leng i sar, 1989). Ove strukture su uskraćene od krvno-moždane barijere i brzo detektuju promene telesnih tečnosti. Aktivirani osmosenzitivni neuroni šalju glutamatergičke ili angiotenzinske projekcije ka PVN-u i SON-u, dok inhibitorni uticaji dolaze preko GABA. U fiziološki zahtevnim uslovima, GABA može postati ekscitatorna, što pojačava sekreciju VP-a u MCN (Kim i sar, 2011).

Osim toga, sami MCN funkcionišu kao osmoreceptori koji detektuju promene osmolalnosti, zahvaljujući spoljašnjim i unutrašnjim mehanizmima i prilagođavaju količinu sintetisanog VP-a (Arima i sar, 1999). Hiperosmolalnost ekstracelularnog okruženja MCN dovodi do kretanja vode iz ćelija u ekstracelularni prostor u cilju izjednačenja koncentracije rastvorenih čestica. Izlazak vode iz ćelija dovodi do njihovog smežuravanja i otvaranja mehanosenzitivnih katjonskih - TRPV kanala pri čemu dolazi do ulaska jona natrijuma i depolarizacije ćelija (Adachi, 2019).

MCN ne oslobađaju VP kontinuirano, već po specifičnom obrascu fazne aktivnosti, koji se sastoji od smene naizmeničnih perioda aktivnosti i mirovanja. Različiti unutrašnji i spoljašnji stimuli mogu uticati na ovaj obrazac fazne aktivnosti (Gouzènes i sar, 1998).

Osmolalnost utiče na faznu aktivnost MCN-a, pa samim tim i na oslobađanje VP-a u sistemsku cirkulaciju. Tokom hiperosmotske stimulacije MCN povećavaju svoju faznu aktivnost, što posledično dovodi do porasta koncentracije VP-a u plazmi. Hipoosmotski stimulus, u vidu smanjene koncentracije natrijuma, vode ili pak zadržavanja tečnosti na periferiji usled vazodilatacije, s druge strane, smanjuje njihovu aktivnost (Oliet i Bourque, 1993).

Osim sekrecije VP-a u sistemsku cirkulaciju, MCN mogu lučiti VP i lokalno, unutar samog jedra. Pokazano je da somatodendritski oslobođen VP iz magnocelularnog regiona aktivira presimpatičke PCN, povećavajući simpatičku aktivnost ka srcu, krvnim sudovima i bubrezima, što doprinosi porastu krvnog pritiska (**Slika 3**) (Ribeiro i sar, 2015).



**Slika 3. Uloga PVN u regulaciji kardiovaskularnog sistema.** PCN - parvocelularni neuroni; MCN - magnocelularni neuroni; PVN - paraventrikularno jedro hipotalamusa; SON -



supraoptičko jedro hipotalamusa; RVML - rostralna ventrolateralna medula; IML - intermediolateralno jedro sive mase kičmene moždine.

### 1.3.3.3. Vazopresin u trudnoći

Vazodilatacija koja se javlja u toku prvog trimestra trudnoće se povezuje sa stimulacijom žeđi, povećanim unosom vode i padom osmolalnosti plazme od približno 8 do 10 mOsm/kg H<sub>2</sub>O sa smanjenjem koncentracije Na<sup>+</sup> u serumu od 4 do 5 mEq/L. Jedan od kompenzatornih mehanizama na sistemsku vazodilataciju je povećana sekrecija VP-a. U odnosu na uobičajene stimuluse, ovde se zapaža tzv. „neosmolarna stimulacija“ koja nastaje usled zadržavanja krvi u perifernim krvnim sudovima i posledičnim padom krvnog pritiska. Usled povećane sekrecije VP-a dolazi do eksprimiranja većih količina akvaporinskih kanala u sistemu distalnih i sabirnih tubula (Davison i sar, 1984).

### 1.3.4. Ostali vazoaktivni molekuli koji doprinose adaptaciji u trudnoći

U prvom trimestru, vazodilatatorni efekti NO, prostaglandina i progesterona rezultuju perifernom vazodilatacijom, što na duže staze, već od 8. nedelje gestacije dovodi do porasta udarnog volumena srca za 20%. Periferna vazodilatacija je odgovorna i za pad perifernog vaskularnog otpora, što aktivira kompenzatorne mehanizme koji dovode do daljeg povećanja udarnog volumena srca do 40%. Vazodilatatorni efekti su direktno odgovorni i za smanjenje krvnog pritiska rano u trudnoći, sa najnižim nivoom krvnog pritiska oko 20 - 24 nedelje gestacije, što je poznato još i kao fiziološka gestacijska hipotenzija (Kodogo, Azibani, i Sliwa 2019).

Navedene promene u vaskularnom tonusu značajno korelišu sa povećanim nivoima estrogena i progesterona čija sekrecija fluktuiru tokom trudnoće. Pored ovih, navodi se i značaj relaksina - peptidnog hormona koji proizvodi *corpus luteum* i *placenta*. Najbolje proučen periferni mehanizam koji izaziva vazodilataciju je dejstvo relaksina, hormona koga uglavnom stvaraju žuto telo i posteljica (Osol, Ko, i Mandalà, 2019). U ranoj trudnoći, relaksin direktno deluje na renalnu i sistemsku vaskulaturu, uglavnom preko endotelnih vazodilatacijskih puteva posredovanih NO, uključujući matriksne metaloproteinaze (MMPs), endotelnu sintazu azot monoksida (eNOS) i sam NO (Leo i sar, 2017). Relaksin povećava ekspresiju i sintezu endotelnog NO i matriksnih metaloproteinaza vaskularnog zida, koje razlažu kolagen i doprinose elastičnosti krvnih sudova, povećavajući ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), prostanoida (prostaglandina, tromboksana, prostaciklina) i hiperpolarizacionog faktora izvedenog iz endotela (EDHF) i podstičući placentaciju (Osol, Ko, i Mandalà 2019; Leo i sar, 2017). Koncentracija relaksina raste u lutealnoj fazi ovulatornog ciklusa, a ako dođe do začeća, koncentracije dostižu maksimum na kraju prvog trimestra kad postepeno opadaju na prosečne vrednosti tokom cele trudnoće. Ovaj hormon ima ulogu u endotelno - zavisnoj vazodilataciji tokom trudnoće sa posebnim akcentom delovanja na male krvne sudove u kojima je povećan vaskularni otpor (Conrad 2011; Kristiansson i Wang 2001).

#### 1.4. Hronična hipertenzija u trudnoći

Epidemiološke studije pokazuju da je hronična hipertenzija prisutna kod 3-5% trudnica i predviđa se porast broja trudnica sa hroničnom hipertenzijom zbog pomeranja starosne granice začeca i povećanja stope gojaznosti (Seely i Ecker 2014). Hronična hipertenzija je definisana kao povišen krvni pritisak iznad 140 mmHg, za sistolni, i 90 mmHg, za dijastolni pritisak pre trudnoće ili pre 20. nedelje gestacije i predstavlja jedan od glavnih uzroka maternalnog, fetalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta u svetu ("Hypertension in Pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy" 2013). Najčešće komplikacije hronične hipertenzije u trudnoći su: (1) superponirana preeklampsija (17-25%); (2) fetalni zastoj u rastu bez superponirane eklampsije majke (21%) i sa eklampsijom (41%); (3) prekid ili otkidanje (abrupcija) posteljice 1,56% (0,58% kod zdravih žena); (4) prevremeni porođaj (< 37 nedelja gestacije) i carski rez u 12% - 34% kod žena sa hroničnom hipertenzijom, a 62% - 70% kod žena sa teškom hipertenzijom (Seely i Ecker 2014). Hipertenzija komplikuje 5 - 7% svih trudnoća (Lindheimer, Taler, i Cunningham 2010). Lečenje hipertenzije je neophodno, ali postojeći lekovi mogu imati štetna dejstva na razvoj i rast ploda i novorođenčeta (Lindheimer, Taler, i Cunningham 2010). Takođe, postojeća antihipertenzivna terapija ne utiče na ishod trudnoće, niti smanjuje rizik od pojave neželjenih efekata ili komplikacija (LeFevre i Krumm 2019). Međutim, nije sasvim poznato kako se u hroničnoj hipertenziji autonomni nervi sistem adaptira na trudnoću i kako se menja funkcija barorefleksa. Otkrivanje mehanizma autonomne adaptacije bi podstaklo otkrića novih target mesta za razvoj efikasnijih antihipertenzivnih lekova u hronično hipertenzivnoj trudnoći.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Određivanje vrednosti hemodinamskih parametara (SBP, DBP i HR) kod hipertenzivnih SHR ženki pod bazalnim uslovima (u diestrus fazi), desetog (10.) i dvadeset prvog (21.) dana gestacije, prvog (1.) i petog (5.) postpartalnog dana, poređenje u vremenu i u odnosu na normotenzivne ženke.
- Određivanje parametara autonomne kontrole - varijabilitet BP, varijabiliteta HR i BRS kod hipertenzivnih SHR ženki i njihovih normotenzivnih Wistar kontrola pod bazalnim uslovima (u diestrus fazi), desetog (10.) i dvadeset prvog (21.) dana gestacije i poređenje u vremenu.
- Određivanje koncentracije VP-a u plazmi i ekspresije gena za VP, V1aR i V1bR u PVN-u i SON-u hipertenzivnih SHR pacova pod bazalnim uslovima (u diestrus fazi ciklusa) i poslednjeg dana gestacije i upoređivanje u odnosu na normotenzivne Wistar ženke.

### 3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je dobilo odobrenje Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (broj dozvole 119-01-13/17/2015-09). Sa laboratorijskim pacovima je postupano u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja 2009/6/RS i Pravilnikom 2010/RS Republike Srbije.

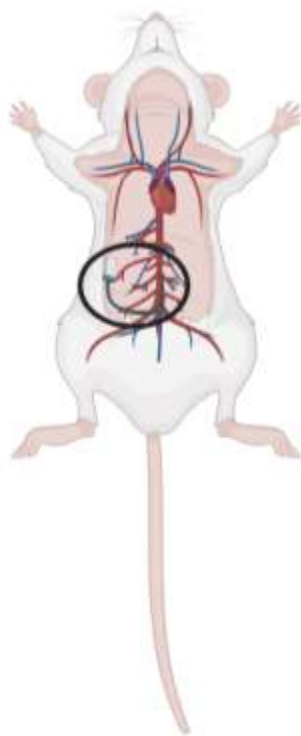
#### 3.1. Ogledne životinje

Ispitivanje je sprovedeno na dva soja, ženka spontano hipertenzivnih pacova (*Spontaneously hypertensive rats* - SHR) i ženka normotenzivnih pacova Wistar soja (*Wistar rats* - WR). U eksperimentu je korišćeno ukupno 44 životinja starosti 12 nedelja i telesne mase 180 - 250 grama, poreklom iz Uzgajivačnice Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimenti su izvedeni u Animalnom bloku Laboratorije za kardiovaskularnu farmakologiju pod kontrolisanim uslovima: 12/12 časova ciklus svetlo-tama, početak ciklusa 7:00 časova ujutro, ambijentalna temperatura  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  i vlažnost vazduha  $60 \pm 5\%$ . Ženke su bile pojedinačno smeštene u providne polikarbonatne kaveze, dimenzija 425 x 266 x 185 mm i površine poda 800 cm<sup>2</sup> (1291H EUROSTANDARD TYPE III H, Tecniplast Italy) sa slobodnim pristupom standardnoj pelatiranoj hrani za glodare (0.2% sadržaj natrijuma, Veterinarski zavod, Subotica) i svežom pijaćom vodom. Ogledu je prethodio dvonedeljni period prilagođavanja pacova na novu sredinu, eksperimentatora i uzorkovanje vaginalnih briseva. Tokom ogleda praćeno je zdravstveno stanje i dobrobit eksperimentalnih životinja (praćenje ponašanja: umivanje, češkanje, uzimanje hrane, vode; spoljni izgled, odsustvo bolesti, vitalni parametri) svakog radnog dana najmanje dva puta, ujutru u 8:00 i po podne u 14:00 časova, a po potrebi i češće. Životinje su vikendom i praznikom proveravane jednom dnevno. Na kraju eksperimenta, telemetrisane ženke su eutanazirane cervikalnom dislokacijom, dok je za životinje žrtvovane za potrebe uzorkovanja krvi i mozga korišćen metod dekapitacija giljotinom.

#### 3.2. Hirurška procedura ugradnje radiotelemetrijskog uređaja

Po šest ženki oba soja, WRs (N=6) i SHRs (N=6), uvedeno je u kombinovanu anesteziju intraperitonealnom administracijom ketamina (*Ketamidol, Richter Pharma AG, Austrija*, 10%; 90 mg/kg, i.p.) i ksilazina (*Xylased, Bioveta, Češka*, 2%; 10 mg/kg, i.p.). Dubina anestezije je proveravana ispitivanjem kornealnog i pedalnog refleksa. Nakon preoperativne trihotomije, životinje su fiksirane u supinatornom položaju, operativno polje je dezinfikovano upotrebom 3% rastvora vodonik-peroksida (Apotekarska ustanova Beograd, Beograd, Republika Srbija) i 10% rastvora povidon joda za kožu (Hemofarm, Vršac, Srbija), te je načinjena 3 cm duga, medijalna incizija prednjeg trbušnog zida. Po otvaranju trbušne duplje, eksponirani crevni sadržaj je laganim pritiskom sterilnih štapića (za uzorkovanje brisa) razmaknut, dodatno potisnut urolanim kompresama (dimenzija 5x5cm, prethodno dobro navlaženih sterilnim

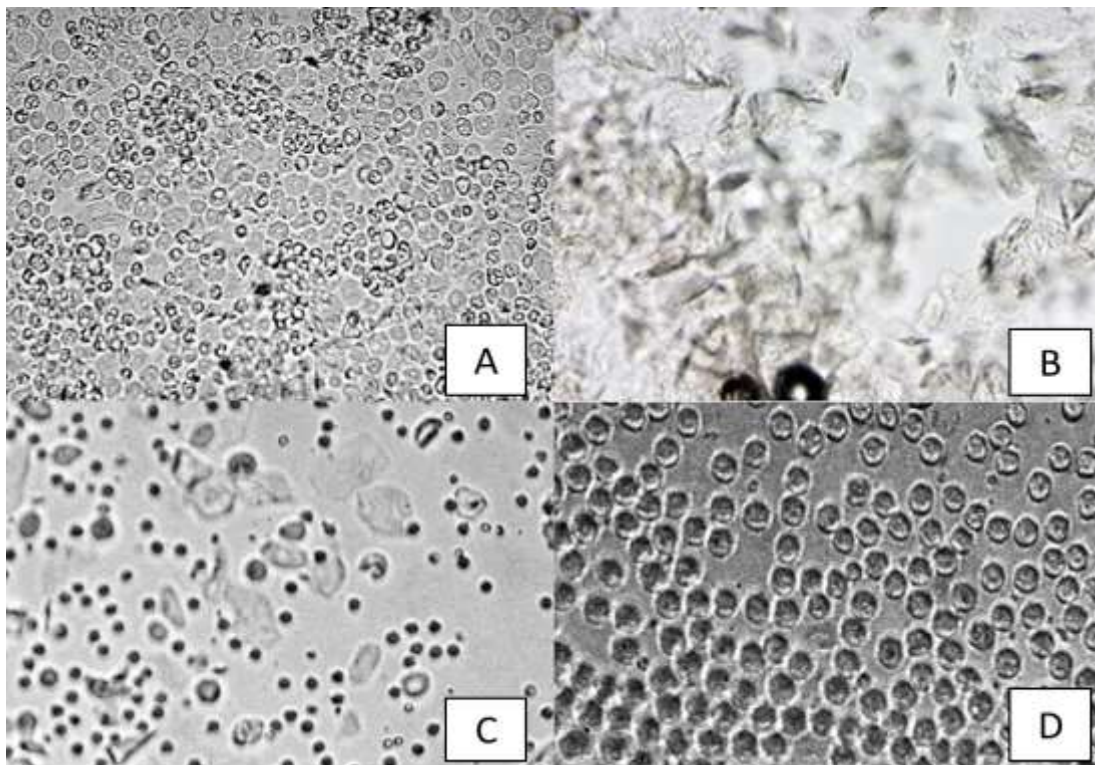
fiziološkim rastvorom) i definitivno osiguran primenom retraktora. Time je omogućen pristup retroperitonealnom prostoru i vizuelizacija abdominalne aorte. Nakon uklanjanja masnog tkiva i veziva, aorta je pažljivo razdvojena od donje šuplje vene, i privremeno podvezana na dva mesta, neposredno ispod odvajanja renalne arterije i iznad bifurkacije same aorte. Nakon punkcije aorte, specifično zakrivljenim vrhom igle od 21G, vrh katetera radiotransmitera (*TA11-PA C40; DSI, Transoma Medical, St Paul, MN, USA*) je insertovan u lumen krvnog suda pomoću specijalne pincete - vođice, a nakon provere pozicije katetera, isti je fiksiran pomoću tkivnog lepka (*3M Vetbond™*) i tkivne celulozne zakrpe (*DSI, Transoma Medical*). Po uklanjanju privremene okluzije, retraktora i kompresa, telo radiotelemetrijskog uređaja je pozicionirano u trbušnu duplju i šavovima osigurano za prednji trbušni zid (**Slika 4**). Radi prevencije dehidratacije životinje, intestinum je pred zatvaranje ovlažen manjom količinom fiziološkog rastvora, prethodno zagrejanog na telesnu temperaturu pacova. Hiruška incizija je zatvorena pojedinačnim šavovima, u dva sloja, mišićni i kožni, primenom neresorptivnog hiruškog konca. Sav potrošni materijal korišćen je sterilan, a za sterilizaciju hiruških instrumenata primenjivan je aparat za dekontaminaciju suvom toplotom (*GERMINATOR 500™, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA*). Telesna temperatura životinje je tokom operacije i 30 minuta po završetku intervencije, održavana na grejnoj podlošci (*Heating pad, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA*). Postoperativno, rana je svakodnevno čišćena rastvorima vodonik-peroksida i povidon joda. Za prevenciju infekcije, perioperativno primenjivan je Gentamicin (*Hemofarm, Vršac, Republika Srbija, 25 mg/kg, i.m.*). Za kupiranje bola, pola sata pre hiruške intervencije, kao i naredna tri postoperativna dana, životinjama je aplikovan Karprofen (*Rimadyl®, Phizer Ltd, UK, 5 mg/kg/day, s.c.*). Period oporavka je trajao najmanje dve nedelje, što je prema literaturi dovoljno za potpuni oporavak ženki pacova, uključujući restoraciju telesne mase i reproduktivnog ciklusa (*Takezawa, Hayashi, Sano, i Ebihara 1994*).



**Slika 4.** Prikaz insertovanog transmitera u abdominalnu aortu laboratorijskog pacova.

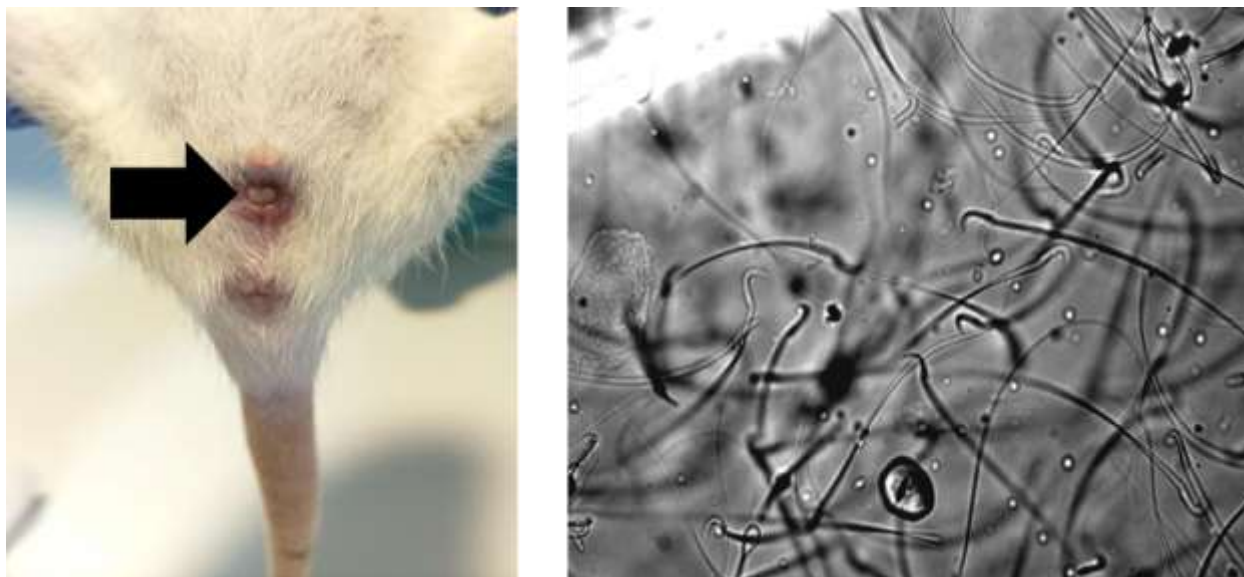
### 3.3. Određivanje faze ciklusa i potvrda trudnoće

Za određivanje faze estrusnog ili polnog ciklusa, ženke pacova Wistar i SHR soja, su pregledane svakodnevno, u periodu od mesec dana (dve nedelje pre hirurške implantacije transmeta, tokom perioda oporavka i prikupljanja podataka). Vaginalni bris je uzorkovan na bezbolan način pomoću automatske pipete i fiziološkog rastvora (NaCl). Plastični vrh pipete (prethodno napunjen sa 10  $\mu$ L 0,9% NaCl) je umetnut u sam vestibulum vagine, tečnost je ubrizgana, a odmah zatim i aspirirana u cilju prikupljanja vaginalnih ćelija. Tako aspirirana kap zapremine 10  $\mu$ L posmatrana je kao nativni preparat na staklenoj pločici pod uveličanjem 10x i 40x na svetlosnom mikroskopu. U neobojenom vaginalnom razmazu, tj. na nativnom preparatu vaginalnog brisa ženke pacova, mogu se prepoznati tri tipa ćelija: epitelne ćelije okruglog oblika sa jedrom, orožale, kornealne ćelije nepravilnog oblika bez jedra i leukociti, koji se vide kao najmanje okrugle ćelije. Regularni estrusni ciklus ženki pacova u proseku traje četiri do pet dana i deli se u četiri faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus. Faze ciklusa su određivane na osnovu proporcionalne zastupljenosti tri tipa ćelija (epitelne ćelije, kornealne ćelije i leukociti) prisutnih u razmazu vaginalnog brisa (**Slika 5**) (Marcondes, Bianchi, i Tanno 2002; J. M. Goldman, Murr, i Cooper 2007). Prema Marcondes i sar, nalaz brisa u kome dominiraju epitelne ćelije označava da je ženka u fazi proestrusa; faza estrusa je determinisana vaginalnim brisom u kojem preovlađuju kornealne ćelije; dok ramaz vaginalnog brisa ženke u metestrusu pokazuje podjednak udeo leukocita, rožnatih i epitelnih ćelija. Diestrus fazu ciklusa prati vaginalni bris u kome dominira prisustvo leukocita (Marcondes, Bianchi, i Tanno 2002). Bazalne, fiziološke vrednosti kardiovaskularnih hemodinamskih parametara, registrovane su u diestrus fazi telemetrisanih ženki pacova.



**Slika 5.** Prikaz nativnog preparata razmaza vaginalnog brisa u sve 4 faze ciklusa. A. Proestrus faza - dominacija epitelnih ćelija. B. Estrus faza - dominacija kornealnih ćelija. C. Metestrus - podjednaka zastupljenost epitelnih ćelija, kornealnih ćelija i leukocita. D. Diestrus - dominacija leukocita.

Prisustvo spermatozoida ili vaginalnog čepa, jutro nakon što su telemetrisana ženka u proestrus fazi ciklusa i seksualno iskusan mužjak odgovarajućeg soja proveli noć zajedno u istom kavezu, markirao bi nulti dan gestacije (**Slika 6**). Prosečno vreme trajanja trudnoće za WRs je 21 dan, dok je za SHRs 22 dana (podaci iz naše uzgajivačnice).



**Slika 6.** Na levoj slici, crnom strelicom - vaginalni čep. Na desnoj slici - prikaz nativnog preparata razmaza vaginalnog brisa sa prisutnim spermatozoidima. Oba nalaza odgovaraju 0 danu graviditeta.

### 3.4. Eksperimentalni dizajn

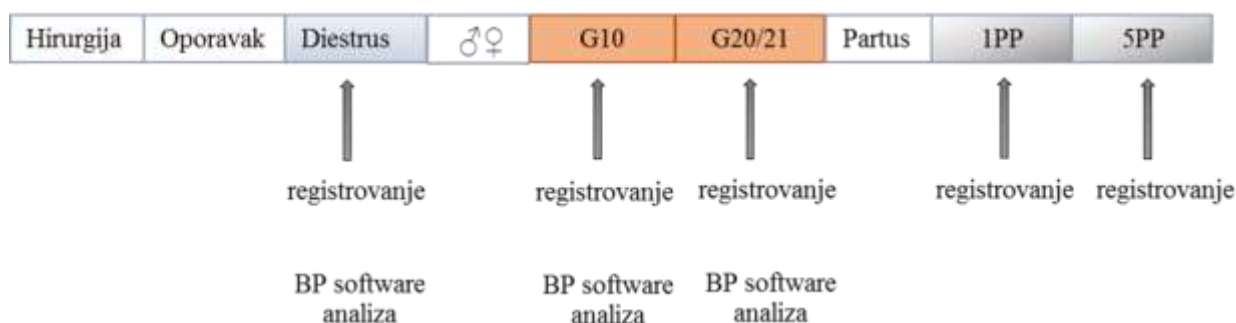
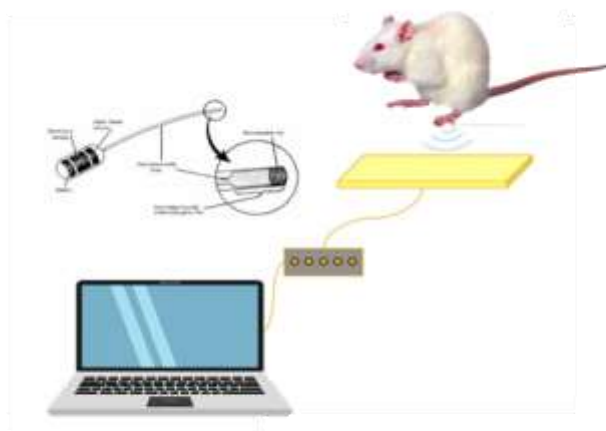
Za potrebe radiotelemetrije, životinje su metodom slučajnog odabira podeljene u 2 eksperimentalne grupe: WR ženke (n=6) i SHR ženke (n=6). Pojedinačno smeštene, telemetrisane SHR i WR ženke, podvrgnute su po prethodno utvrđenom protokolu kontinuiranom merenju kardiovaskularne hemodinamike u trajanju od najmanje 30 minuta. Signali su prikupljeni u mirnom i tihom ambijentu boksa za telemetriju, uz obaveznu prethodnu dvočasovnu adaptaciju na premeštanje u boks. Podaci su prikupljeni na budnim, slobodno pokretnom ženkama, pre trudnoće - na dan diestrus faze polnog ciklusa, u sredini (10. dan gestacije) i na kraju trudnoće (20/21 gestacijski dan), kao i prvog i petog dana postpartalno (**Slika 7**). Prvo registrovanje BP i HR je kontrolno snimanje. Po završetku protokola, telemetrisani pacovi su eutanazirani cervikalnom dislokacijom.



### DSI radiotelemetrijski uređaj

SHR ŽENKE (n=6)

WR ŽENKE (n=6)



**Slika 7.** Šematski prikaz protokola registrovanja hemodinamskih parametara u diestrusu (kontrolno snimanje), tokom trudnoće (G10: 10. dan gestacije, G20/21: 20/21. dan gestacije) i postpartalno. (1PP: 1. postpartalni dan, 5PP: 5. postpartalni dan).

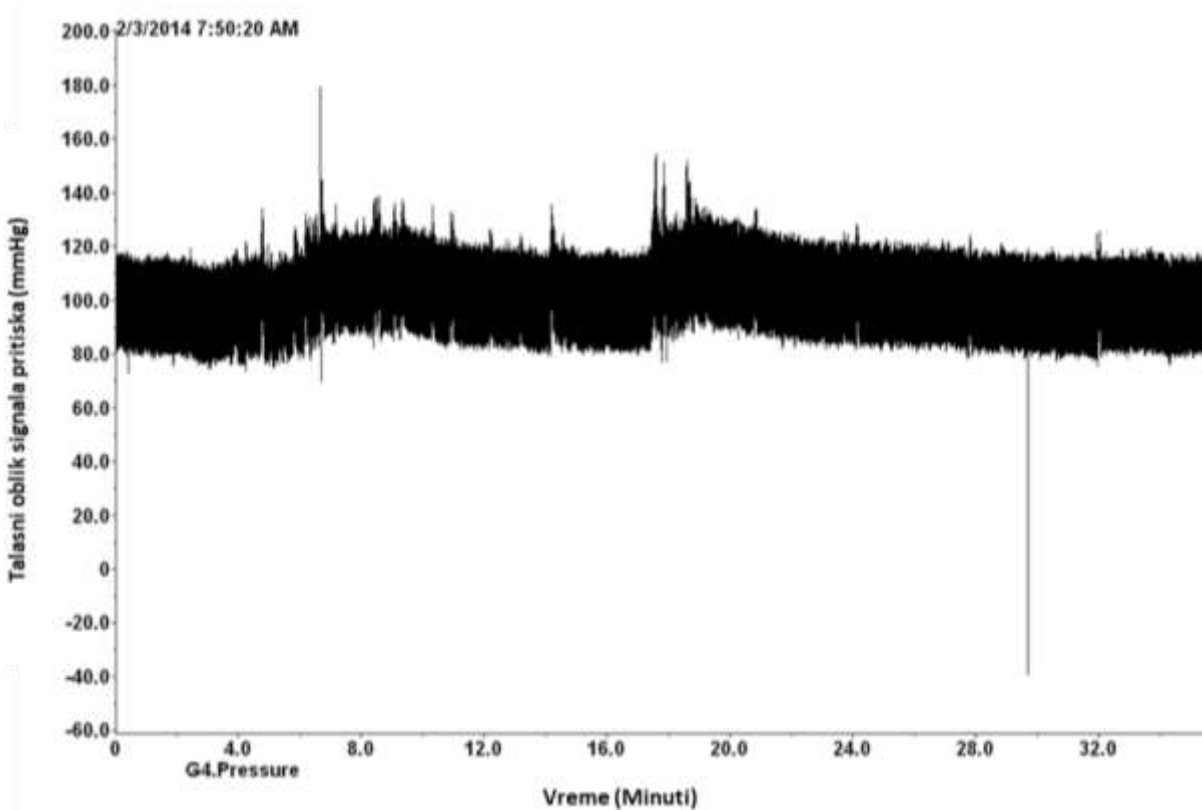
## 3.5. Registracija i obrada signala

### 3.5.1. Registracija BP i HR i analiza kardiovaskularne varijabilnosti

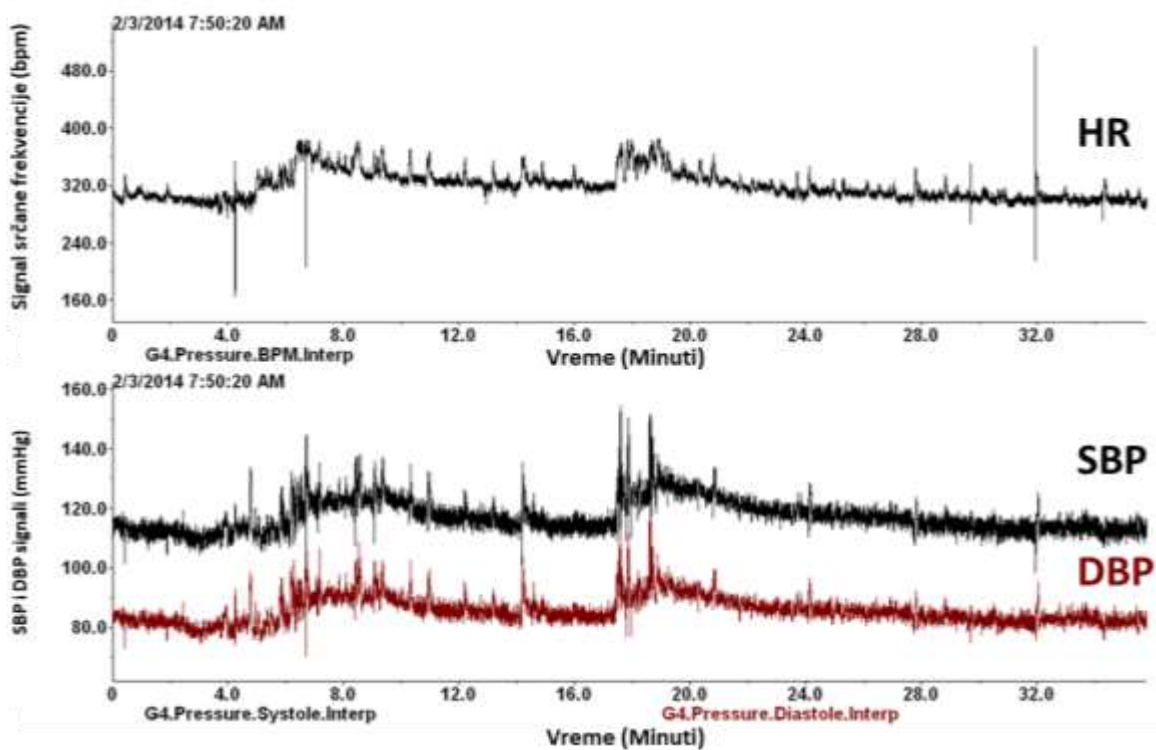
Signal arterijskog BP je emitovan sa radiotelemetrijskog uređaja smeštenog u telu pacova do prijemnika (pozicioniran neporedno ispod kaveza), a zatim prenošen do računara opremljenog softverom *Dataquest A.R.T.4.0.* (DSI, Transoma Medical, St. Paul, USA) specijalizovanim za prikupljanje i obradu kardiovaskularnih signala. Arterijski pritisak je digitalizovan na 1000 Hz korišćenjem *Dataquest A.R.T. 4.0* softvera (DSI, Transoma Medical, St. Paul, USA), a zatim podsemplovan na 20 Hz u istom softveru (**Slika 8**). Sistolni krvni pritisak (SBP), dijastolni krvni pritisak (DBP) i pulsni interval (PI) ili njegova inverzna vrednost - srčana frekvencija (**Slika 9**), su izvedeni iz arterijskog pulsno talasa, za potrebe spektralne analize sa



vremenskom rezolucijom od 50ms, a za potrebe procene spontane barorefleksne osetljivosti sa vremenskom rezolucijom od 1ms, kao maksimum, minimum i interbitni interval.



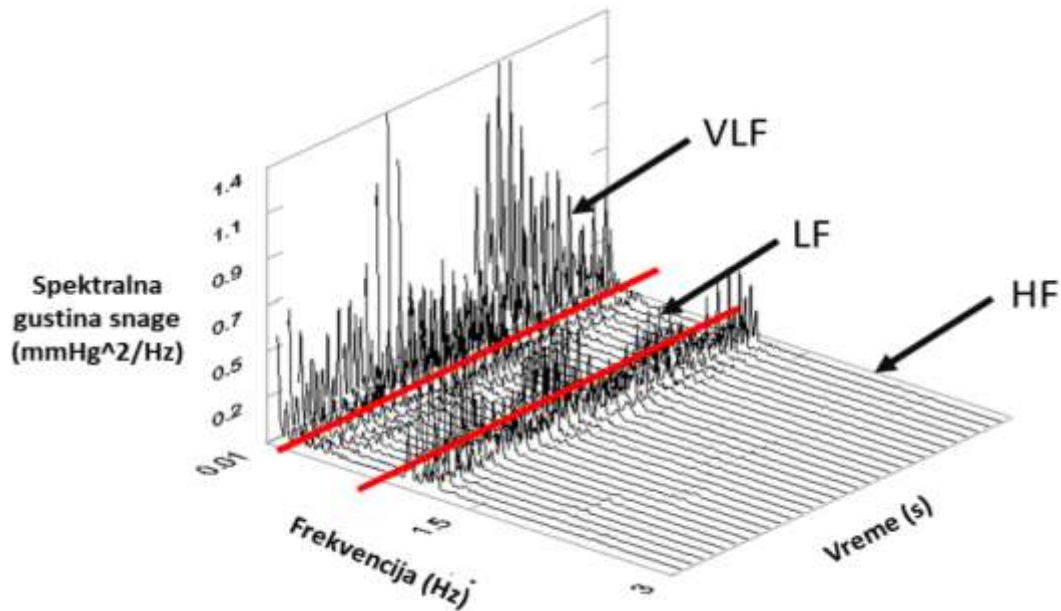
Slika 8. Pulsni talas WR ženke u diestrus fazi ciklusa; kontrolno snimanje u DSI programu.  
*DSI* program.



**Slika 9.** SBP, DBP i HR izvedeni iz pulsog talasa WR ženke u diestrus fazi ciklusa (kontrolno snimanje); SBP- sistolni arterijski pritisak. DBP- dijastolni arterijski pritisak. HR- srčana frekvencija. Originalni zapis, *DSI* program.

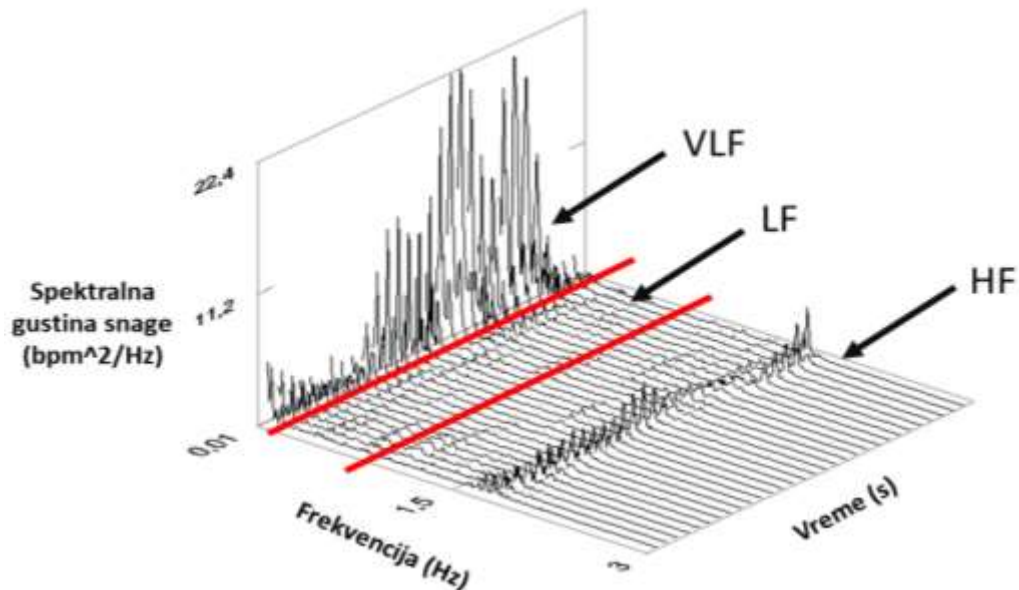
Varijabilitet BP-a i HR-a je softverski (*BP Complete*) procenjen spektralnom analizom metodom Velčovih periodograma. Nakon manuelne eliminacije artefakta, 410s dugi stacionarni segmenti su izabrani za analizu spektra snage na 30 vremenskih serija od 2048 tačaka koje se preklapaju, a parametri koji se koriste prikazani su u radu Lozić i dr. (Lozić i sar, 2016). Spektralna gustina snage sistolnog, dijastolnog arterijskog krvnog pritiska i srčane frekvencije su analizirani do 3 Hz (totalni volumen;  $TV=0.00976-3$  Hz) i u tri zone: veoma niskih frekvencija (*very low frequency*;  $VLF=0.00976-0.195$  Hz), niskih frekvencija (*low frequency*;  $LF=0.195-0.8$  Hz) i visokih frekvencija (*high frequency*;  $HF=0.8-3$  Hz) (**Slika 10, 11**). Izračunat je i LF/HF-HR indeks kao pokazatelj simpatovagalnog balansa u srcu (Hayano i Yuda 2021). LF-BP i LF/HF-HR su klinički ("*Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology*" 1996; G. Parati i sar, 1995) i eksperimentalni (A. Malliani i sar, 1991; Tasić i sar, 2017; Japundzic-Zigon 1998) kao i Tasić i sar, 2017; Japundzic-Zigon 1998) markeri simpatičkog uticaja na arterijske krvne sudove i simpatovagalnog balansa u srcu.

## Spektralna gustina snage SBP



**Slika 10.** Spektralna gustina snage SBP signala sa obeleženim zonama. VLF (*very low frequency*)-zona veoma niskih frekvencija, LF (*low frequency*)- zona niskih frekvencija, HF- (*high frequency*)-zona visokih frekvencija. BP Complete program.

## Spektralna gustina snage HR



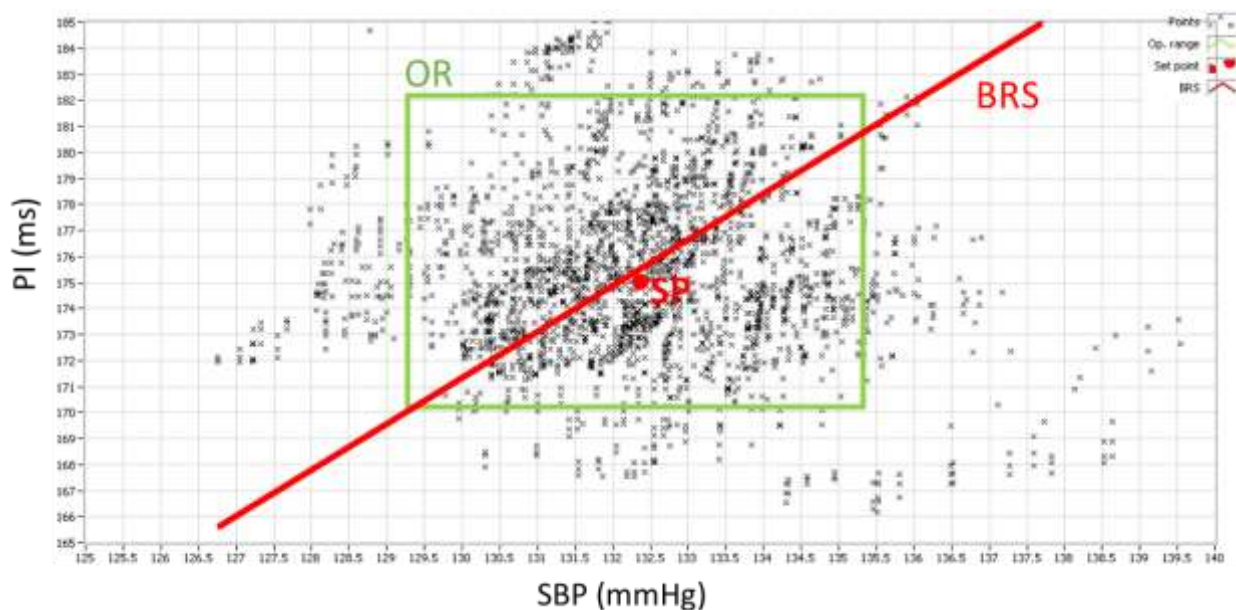
**Slika 11.** Spektralna gustina snage SBP signala sa obeleženim zonama. VLF (*very low frequency*)-zona veoma niskih frekvencija, LF (*low frequency*)- zona niskih frekvencija , HF- (*high frequency*)-zona visokih frekvencija. BP Complete program.

### 3.5.2. BRR evaluacija metodom sekvence

Spontani baroreceptorski refleks je analiziran metodom sekvenci na signalu pulsne talase duzine 409.6 sekundi (Bertinieri i sar, 1985). Sekvenca spontanog baroreceptorskog refleksa je niz vrednosti sistolnog krvnog pritiska koji se uzastopno povećava/smanjuje, praćen nizom vrednosti pulsne intervale koji se povećava/smanjuje, pomerene za 3, 4 ili 5 otkucaja u odnosu na sistolni krvni pritisak (Stauss i sar, 2006). Prag duzine sekvence je postavljen na četiri otkucaja sto znaci pet parova sistolni pritisak-pulsni interval (Turukalo, Bajic, i Zigon 2011). Pomenuti pomeraj predstavlja broj otkucaja potreban da BRR refleksno promeni PI kao odgovor na na promenu sistolnog pritiska. Za metod sekvence, BP Complete softver analizira PI i SBP sekvence jer je u sekvencama odnos između SBP i intervalnih PI odgovora približno linearan. Ne koristi se HR jer je odnos između pulsne intervale i HR inverzan, pa je relacija koja povezuje SBP i HR približno hiperbolična. Prvi korak u analizi BRR-a podrazumeva kompjutersku pretragu vremenskih serija SBP-a i PI i identifikaciju dovoljnog broja uzastopnih otkucaja pri kojima se SBP i PI menjaju u istom smeru (rast/pad). Parametri koji opisuju BRR i koji su analizirani u ovoj studiji su (**Slika 12**):

1. Osetljivost refleksa baro-receptora [ms/mmHg] se procenjuje kao usrednjena vrednost koeficijenta linearne regresije koji su izracunati za svaku identifikovanu sekvencu posebno (Dominique Laude i sar, 2004) i izvodi se iz relacije:  $SBP = BRS \times PI + const$ , tako da je  $BRS = (SBP - const) / PI$ , gde je const aditivna konstanta.
2. Težište rada baro-receptorskog refleksa se izvodi kao dvodimenzionalna medijana svih parova sistolni krvni pritisak - pulsni interval koji su čine identifikovane sekvence.
3. Radni Opseg delovanja (*engl. operating range - OR*) se procenjuje kao površina pravougaonika pulsne intervale i sistolnog krvnog pritiska koja obuhvata preko 95% svih vrednosti sekvenci (mmHg x ms) (Bajić i sar, 2010).

Unapređena metoda koja omogućava vizualizaciju barorefleksne sigmoide za svakog subjekta prikazana je u radu Jovanovic i saradnici (Jovanovic i sar, 2018).



**Slika**

**12.** BRS - procenjena senzitivnost spontanog baroreceptorskog refleksa - crvena linija. OR - opseg delovanja spontanog baroreceptorskog refleksa - zeleno oivčeni pravougaonik. SP - težište rada spontanog baroreceptorskog refleksa - crvena tačka predstavlja medijanu svih parova sistolnog krvnog pritiska [mmHg] i pulsno intervala [ms]. SBP- sistolni arterijski krvni pritisak. PI- pulsni interval. *BP Complete* program.

### 3.6. Uzorkovanje krvi i mozgova

Novi četiri grupe ženki, diestrus WRs (N=8), diestrus SHR (N=8), 20. dan gravidne WRs (N=8) i 21. dan gravidne SHRs (N=8) prethodno sparene u Animalnom bloku, eutanazirane su odsecanjem glave giljotinom (*Rat guillotine, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA*). Nakon dekapitacije, prikupljeni su krv iz trupa i mozgovu za dalju analizu. Uzorci krvi su uzeti i obrađeni prema uputstvu proizvođača ELISA kita i čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$  do određivanja koncentracije VP u plazmi. Mozgovu su trenutno smrznuti tečnim azotom (Messer, Beograd, Srbija) i odloženi na  $-80^{\circ}\text{C}$  za dalje PVN i SON uzorkovanje.

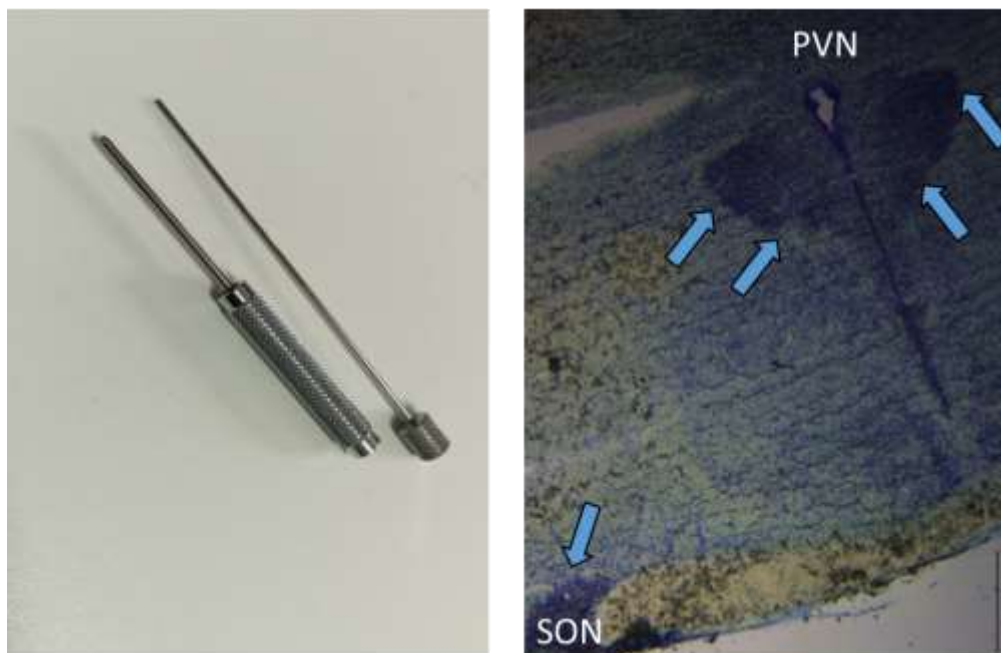
#### 3.6.1. Uzorkovanje tkiva paraventrikularnog i supraoptičkog jedra iz duboko smrznutih mozgova

Za orijentaciju prilikom sečenja moždanog tkiva korišćen je atlas mozga pacova sa stereotaksičnim koordinatama (Paxinos i Watson 2006). Koristeći kriostat (*Leica Microsystems CM1900, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Nussloch, Germany*), uzeti su kaudalno-rostralni iseći mozga debljine  $60\ \mu\text{m}$  i obojeni toluidin plavim (1% [v/v] u 70% [v/v] ] etanol, *Sigma-Aldrich Co. Ltd., Poole, Dorset, UK*) za mapiranje i verifikaciju hipotalamusa - slika 12. Neobojeno tkivo SON i PVN je punktirano bilateralno i uzeto je 1 mm tkiva u prečniku, korišćenjem puncher-a, 15-G iglice za mikro-uzorkovanje (**Slika 13 i 14**) (*Sample Corer, Fine Science Tools Inc.,*

Foster Citi, CA, SAD, kat. br. 18035-01). Uzorkovano hipotalamusno tkivo čuvano je u RNKaza slobodnim epruветama (ISOLAB Laborgerate GmbH, Eschau, Germany) na - 80°C.



**Slika 13.** Levo; Mozak pacova fiksiran na podlošci za sečenje tkivnim matriksom (Bio-Optica, Milano, Italy). Desno: Mozak pacova nakon presecanja u nivou bregme i započetog sečenja.



**Slika 14.** Levo. Igla za mikro uzorkovanje. Desno. Izgled PVN-a i SON-a obojenog toluidin plavim; Isečak dobijen na poziciji -1,32 mm do -1.44 mm od bregme. Uveličanje 40x.



### 3.6.2. Molekularno biološke metode za procenu ekspresije mRNA VP, V1aR i V1bR kod PVN i SON pacova

#### 3.6.2.1. Homogenizacija tkiva

Homogenizacija tkiva na ledu sprovedena je hemijskim putem u 500  $\mu$ L TRIzol rastvora (*Life Technologies, Carlsbad, USA*) uz mehaničko dejstvo ultrazvučnog homogenizatora *Sonopuls UW 2070* (Bandelin, Berlin, Nemačka). Ultrazvučno je delovano na tkivo u 3-4 periodična ciklusa u trajanju od 1 min sa amplitudom od 15-20% uz neprekidno hlađenje uzorka kako bi se prevenirala razgradnja ribonukleinske kiseline (RNK) usled toplote oslobođane tokom procesa mehaničke homogenizacije.

#### 3.6.2.2. Izolacija ukupne ribonukleinske kiseline

Ukupna RNK je iz homogenizovanog tkiva izolovana pomoću 100  $\mu$ L hloroforma (*SigmaAldrich, Taufkirchen, Germany*). Centrifugiranjem uzoraka na 12000 rpm obrtaja na +4°C tokom 15 min (*Labnet International, Inc., New Jersey, USA*) istaložen je ćelijski debris, a dobijeni nadtalozni koji su sadržali ukupnu RNK su pipetirani u nove sterilne epruvete (*Isolab, Wertheim, Germany*). RNK je dalje precipitirana tako što je u svaki uzorak dodato 250  $\mu$ L 2-propranola (*Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka*). Uzorci su kratko promešani na mešalici, inkubirani 10 min na 25°C, a potom centrifugirani na +4°C, 12000 rpm tokom 15 min. Ovim postupkom izdvajaju se tri jasno definisane faze ili sloja: gornja vodena faza sa RNK, interfaza sa DNK i donja organska faza sa proteinima. Gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK je pažljivo aspirirana automatskom pipetom bez narušavanja granica između faza i prebačena je u nove epruvete. Vodena faza sa ukupnom RNK-a je prečišćena pomoću 500  $\mu$ L 70% rastvora etanola (*Zorka farma, Šabac, Srbija*) tokom petominutnog centrifugiranja na +4°C, 7500 rpm. Nadtalog je uklonjen iz svakog uzorka i izolovana RNK je rastvorena u vodi bez ribonukleaza (*Qiagen, Hilden, Germany*). Uzorci izolovane RNK su tokom 10 min inkubirani na 55°C u termobloku (*BioSan, Riga, Latvija*), a zatim odloženi na -80°C. Kvalitet i koncentracije ukupne RNK su za svaki uzorak određene čitanjem apsorbance na 360 nm pomoću *BioSpec-nano* aparata (*Shimadzu, Kyoto, Japan*) na Stomatološkom fakultetu, ljubaznošću prof. dr Branke Popović.

#### 3.6.2.3. Sintaza komplementarne dezoksiribonukleinske kiseline

Komplementarna (engl. *complementary*) DNK (cDNK) je sintetisana iz 100 ng/ $\mu$ L prečišćene RNK pomoću komercijalno dostupnog kita *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*) prema uputstvu proizvođača. Kontaminirajuća genomska DNK (gDNK) je uklonjena iz uzoraka tokom 2 min na 42°C pomoću mešavine gDNK pufera i RNKaza slobodne vode. Reakcija reverzna transkripcije se odvijala pomoću mešavine enzima reverzne transkriptaze, nukleotida (dNTPs) i pufera na 42°C tokom 30 min, a potom je reakcija prekinuta inkubiranjem uzoraka na 95°C tokom 3 min. Korišćenje ovog komercijalnog kita,

omogućava odvijanje transkripcije RNK na nižim temperaturama (42°C) i očuvanje intaktnosti RNK. Tube sa cDNK su čuvane na -20°C.

#### 3.6.2.4. Lančana reakcija umnožavanja polimerazom praćena u stvarnom vremenu (RT- qPCR)

Za izvođenje RT-qPCR korišćen je aparat *Applied Biosystems Vii<sup>TM</sup>7* (Foster City, CA, USA) (Slika 15.)



**Slika 15.** *Applied Biosystems Vii<sup>TM</sup>7 Real-Time PCR* aparat

Triplikati svakog uzorka su nalivani na mikroploče (eng. *plates*) sa 96 raspoloživih bunara (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). U svaki bunar je nalivano po 11  $\mu$ L *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied biosystems, Warrington, UK*) i 1  $\mu$ L cDNK. Uzorci cDNK korišćeni za reakciju lančane polimerizacije u realnom vremenu (engl. *real time quantitative polymerase chain reaction - RT-qPCR*) su razblaženi do najmanje koncentracije dovoljne za odvijanje iste. Korišćeni PCR Master Mix predstavlja mešavinu termostabilne DNK polimeraze, nukleotida (dNTPs), pufera i *SYBR green* boje i sastojao se od: 0.048  $\mu$ L 100 nM prajmera (*Invitrogen, Pacl, UK*), 6  $\mu$ L *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) and 4.9  $\mu$ L RNKaza slobodne vode (*Qiagen, Hilden, Germany*). Pipetiranjem po 12  $\mu$ L RNKaza slobodne vode u triplikatu na svakoj mikroploči obezbeđena je i po jedna PCR kontrolna reakcija (slepa proba). Po nalivanju reakcione smeše u bunare, mikroploče su prekrivene zaštitnom folijom (*Foster City, CA, UK*), a zatim su uzorci centrifugirani 30s, 2500 rpm na Mini plate spinner uređaju (*Labnet International, Inc., New Jersey, USA*) kako bi uklonili mehuriće vazduha.

Reakcija lančanog umnožavanja DNK se odvijala u 40 uzastopno ponovljenih ciklusa po sledećem temperaturnom protokolu (Slika 16):



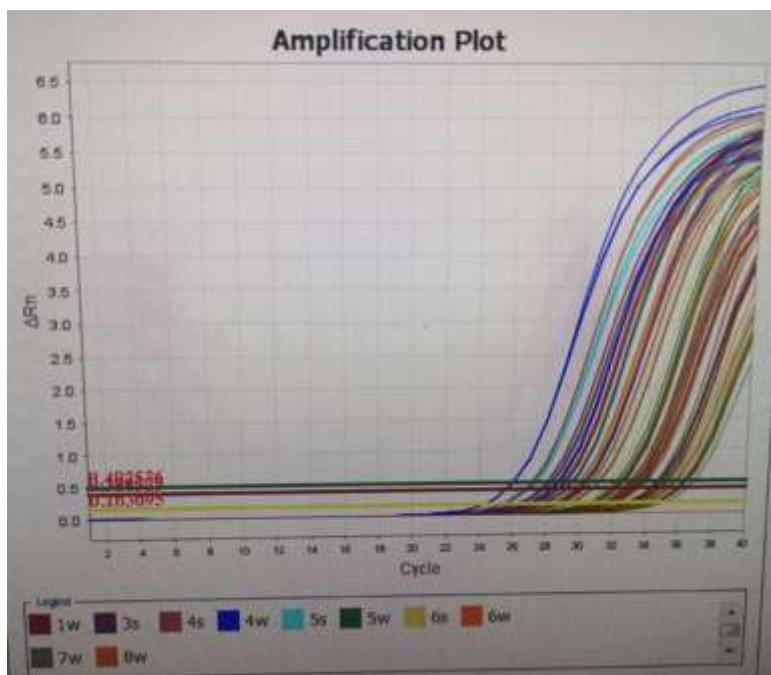
1. denaturacija cDNK (50 °C – 2min, 95 °C – 10min),
2. umnožavanje cDNK 23 (95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min) i
3. terminacija reakcije (95 °C – 15 s, 60 °C – 1 min, 95 °C – 15 s).

Analiza podataka je obavljena korišćenjem ViiA™<sup>7</sup> RT-qPCR softveru (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), a relativna genska ekspresija je određena metodom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Ct predstavlja vrednost pragovnog ciklusa,  $\Delta Ct = Ct$  ispitivani (target) gen -  $Ct$  kontrolni (*housekeeping*) gen,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  uzorka -  $\Delta Ct$  kontrole.

*The Primer Express* program (*The Primer Express software, version 3.0.1, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA*) and GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) baze podataka su korišćene za dizajniranje specifičnih prajmera za:

1. vazopresin gen (*forward/uzvodni prajmer: 5'-GCA CCC ATC AGC CTA ATT CG-3'*; *reverse/nizvodni prajmer: 5'-CGC CAA CCT ATT ATG CCC TAG TA-3'*),
2. V1aR gen (Rn Avpr1a 1 SG QuantiTect Primer Assay, QT00402990, NM053019),
3. V1bR gen (*forward/uzvodni prajmer: 5'-TGCCACATTCTGGAGTACCT-3'*; *reverse/nizvodni prajmer: 5'-AGGACGGTTAACCAAGTAG TGAGATG-3'*) i
4. Rpl19 gen (*forward/uzvodni prajmer: 5'-GCG TCT GCA GCC ATG-3'*; *reverse/nizvodni prajmer: 5'-TGG CAT TGG CGA TTT-3'*) kao kontrolni gen.

RPL19, korišćen kao endogena kontrola (engl. *housekeeping gene*), je gen za ribozomalni protein L19 (engl. ribosomal protein L19 -RPL19). S obzirom da je konstitutivno eskprimiran, ekspresija RPL19 je upotrebljena za normalizaciju ekspresije ispitivanih gena između grupa.



**Slika 16.** Amplifikacijska kriva PCR produkata.

### 3.6.3. Određivanje koncentracije vazopresina u plazmi eksperimentalnih životinja

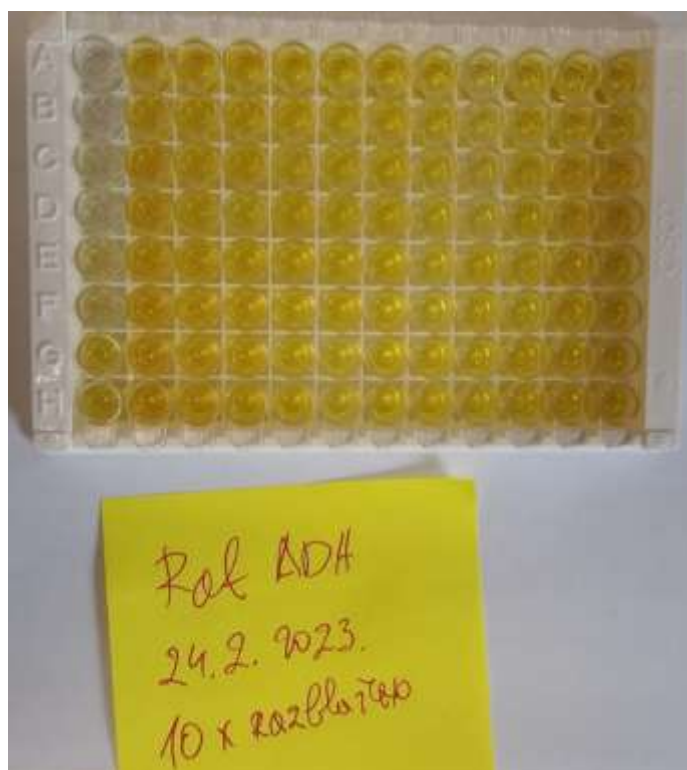
Uzorci krvi iz trupa su sakupljeni u sterilne plastične epruvete, pri čemu je EDTA korišćen kao antikoagulans. Uzorci su centrifugirani 15 min na 1000 x g na 4°C unutar 30 min od uzorkovanja. Dobijeni uzorci plazme su zatim naliveni u sterilne plastične epruvete i držani na -80 °C do analize.

Koncentracije vazopresina u plazmi eksperimentalnih životinja su određene imunoesejskom metodom - ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) primenom *Rat ADH (Antidiuretic Hormone) ELISA Kit (Elabscience Biotechnology Inc., USA)* sa nivoom osetljivosti od 9,38 pg/ml. ELISA test koji je zasnovan na kompetitivnom ELISA principu je sproveden u skladu sa protokolom proizvođača i pomoću čitača mikrotitar ploča (*Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland*).

Princip testa:

Mikro ploča sadrži 96 bunarića koji su obloženi VP pacova (**Slika 17**). Uzorci i standardi se nalivaju u duplikatu. Tokom reakcije, VP u uzorcima plazme eksperimentalnih životinja ili VP u standardu se takmiči u vezivanju sa fiksnom količinom VP u bunarićima mikro ploče, za vezna mesta na biotinu iz *Biotinylated Detection Ab* radnog reagensa specifičnim za VP pacova. Formirani konjugat - vezana jedinica sekundarno antitelo sa biotinom+antigen u višku i nevezani uzorak ili standard se ispiraju. *Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate* rastvor sa enzimom se naliva u svaki bunarić mikro-ploče i inkubira. Zatim se dodaje rastvor sa Tetrametil benzidin (*TMB*) supstratom u svaki bunarić. Dodavanjem rastvora sumporne kiseline za prekid reakcije (engl. *stop solution*), enzim-supstrat reakcija se prekida i plava boja rastvor se menja u žutu. Optička gustina (OD) se određuje korišćenjem čitača podešenog na 450 nm ± 2 nm. Koncentracija VP u analiziranim uzorcima se izračunava upoređivanjem OD uzoraka sa standardnom krivom.

ELISA metod kvantifikacije vazopresina u plazmi eksperimentalnih životinja je sproveden u Istraživačkoj laboratoriji Implantološko-istraživačkog centra Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.



**Slika 17.** Mikroploča na nosaču nakon izvedenog ELISA testa.

### 3.7. Statistička analiza podataka

Rezultati su prikazani grafički i tabelarno, izaženi kao srednja vrednost, standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost. Podaci su analizirani *IBM SPSS software-om (SPSS Statistics v.20 software IBM Corporation, NY, USA)*, dok je za potrebe MIXED ANOVA analize korišćen *R-3.5.0 software (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)*. Normalnost raspodele proveravana je Kolmogorov-Smirnov i Šapiro-Vilkovim (*Shapiro-Wilk*) testom normalnosti. Utvrđeno je odsustvo normalnosti distribucije podataka zbog čega su korišćeni odgovarajući neparametarski testovi. Mixed ANOVA ponavljanih merenja je korišćena za analizu vrednosti osnovnih hemodinamskih parametara kod SHR ženki pod bazalnim uslovima (u diestrus fazi), desetog (10.) i poslednjeg (20./21.) dana gestacije, prvog (1.) i petog (5.) postpartalnog dana i upoređivanje u vremenu i u odnosu na normotenzivne Wistar ženke. Kako je transmitter kod WR5 ženke prestao sa emitovanjem signala postpartalno, umesto nedostajućih vrednosti iz postpartalnog merenja, za potrebe analize korišćene su vrednosti medijana izračunate na osnovu vrednosti parametara iz odgovarajućih merenja ostalih WR ženki. Za svaku eksperimentalnu grupu, kardiovaskularni parametri prikupljeni tokom vremena - u diestrusu, u srednjoj i kasnoj gestaciji procenjavani su nezavisnim Fridmanovim testom. qPCR podaci i podaci o nivou plazme VP analizirani su Kruskal-Wallis-ovim testom (praćen post hoc Wilcoxon testom). Za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

4.1. Hemodinamski parametri kod spontano hipertenzivnih ženki u diestrusu, tokom graviditeta i postpartum u vremenu i u odnosu na Wistar ženke

SHR ženke imale su više vrednosti SBP-a i DBP-a, a niže vrednosti HR-a u odnosu na WR ženke tokom ispitivanog perioda. Sveukupno u posmatranom periodu nije došlo do promene vrednosti SBP, DBP i HR kod ženki oba soja, odnosno postpartalne vrednosti se nisu razlikovale u odnosu na bazalne - diestrus vrednosti (**Tabela 1, 2 i 3**).

**Tabela 1.** Prikaz SBP vrednosti kod WR-a i SHR-ova.

Grupe	Merenje	N	SBP				
			Srednja vrednost	Std. Devijacija	Mediana	Minimum	Maximum
a.WR ženke	1	6	115.0883	5.62485	114.2000	108.22	122.99
	2	6	106.4200	5.09307	106.3850	101.19	112.96
	3	6	86.8567	7.53185	86.8150	78.09	98.30
	4	6	110.6417	5.66489	108.4600	106.05	121.51
	5	6	124.3817	10.42745	123.0300	113.94	144.25
	Ukupno	30	108.6777	14.27873	109.8500	78.09	144.25
b.SHR ženke	1	6	169.1500	16.80624	169.5250	142.23	195.31
	2	6	168.8317	36.84850	158.7250	137.75	240.92
	3	6	123.9350	12.03939	124.7250	108.62	140.62
	4	6	152.6533	24.16395	149.0250	127.89	193.07
	5	6	175.4350	36.86185	160.9850	142.91	243.75
	Ukupno	30	158.0010	31.64857	155.7300	108.62	243.75

Fiksni efekat: SBP ~ Merenje + Grupa

Value Std.Error DF t-value p-value

Merenje 0.96000 1.893356 47 0.507036 0.6145

b.SHR ženke 49.32333 9.876292 10 4.994114 0.0005 \*\*\*

Sveukupno, nije došlo do statistički značajne promene vrednosti SBP-a tokom ispitivanog perioda ( $b=-0.960$ ;  $p=0.615$ ). Sveukupno, u posmatranom periodu, SHR ženke su imale značajno više vrednosti SBP-a ( $b=49.323$ ;  $p=0.0005$ ); Mixed ANOVA,  $***p < 0.001$  vs. WR

u vremenu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost, standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Podaci su analizirani testom Mixed ANOVA ponovljenih merenja, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Merenje 1: diestrus; merenje 2: 10. dan gestacije; merenje 3: kasna gestacija. merenje 4: 1. postpartalni dan; merenje 5: 5. postpartalni dan;

**Tabela 2.** Prikaz DBP vrednosti kod WR-a i SHR-ova.

Grupe	Merenje	N	DBP				
			Srednja vrednost	Std. Devijacija	Mediana	Minimum	Maximum
a.WR ženke	1	6	84.6267	6.05584	85.3350	76.48	90.94
	2	6	78.0383	4.24194	77.4700	72.98	84.15
	3	6	61.0433	5.96597	61.8700	51.62	66.89
	4	6	81.9017	3.58918	82.5500	75.50	86.54
	5	6	91.8200	12.82722	86.4200	84.19	117.54
	Ukupno	30	79.4860	12.45419	81.9200	51.62	117.54
b.SHR ženke	1	6	109.3933	18.08304	100.0150	96.03	140.32
	2	6	116.3100	23.22650	110.7500	93.42	159.22
	3	6	83.2217	14.42968	85.1750	65.26	100.12
	4	6	111.5433	25.59820	115.6000	80.47	149.26
	5	6	120.2350	32.71728	108.8200	94.65	180.27
	Ukupno	30	108.1407	25.65322	100.3800	65.26	180.27

Fiksni efekat: DBP ~ Merenje + Grupa

Value Std.Error DF t-value p-value

Merenje 1.75833 1.474594 47 1.192418 0.2391

b.SHR ženke 28.65467 8.543170 10 3.354102 0.0073 \*\*

Sveukupno, nije došlo do statistički značajne promene vrednosti DBP-a tokom ispitivanog perioda ( $b=1.75833$ ;  $p=0.2391$ ). Sveukupno, u posmatranom periodu, SHR ženke su imale značajno više vrednosti DBP-a ( $b=28.65467$ ;  $p=0.0073$ );  $**p < 0.01$  vs. WR u vremenu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost, standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Podaci su analizirani testom Mixed ANOVA ponovljenih merenja, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Merenje 1: diestrus; merenje 2: 10. dan gestacije; merenje 3: kasna gestacija. merenje 4: 1. postpartalni dan; merenje 5: 5. postpartalni dan;

**Tabela 3.** Prikaz HR vrednosti kod WR-a i SHR-ova.

Grupe	Merenje	N	HR				
			Srednja vrednost	Std. Devijacija	Mediana	Minimum	Maximum
a.WR ženke	1	6	322.0450	14.76264	330.6000	298.92	332.45
	2	6	323.7583	16.09320	320.3850	308.74	353.68
	3	6	368.7333	26.03361	365.4950	335.36	411.26
	4	6	344.7550	28.15744	345.2100	308.94	380.56
	5	6	315.6150	29.93815	305.0800	290.81	374.77
	Ukupno	30	334.9813	29.73303	330.6000	290.81	411.26
b.SHR ženke	1	6	316.0500	15.00832	322.7500	292.66	331.22
	2	6	309.6367	21.30176	309.7750	277.02	337.81
	3	6	332.1750	15.00638	334.7550	307.37	347.44
	4	6	310.8233	33.36124	309.2550	272.60	359.66
	5	6	298.2833	17.16099	296.2300	279.22	322.08
	Ukupno	30	313.3937	22.90266	313.1650	272.60	359.66

Fiksni efekat: HR ~ Merenje + Grupa

Value Std.Error DF t-value p-value

Merenje -1.3105 2.293092 47 -0.57150 0.5704

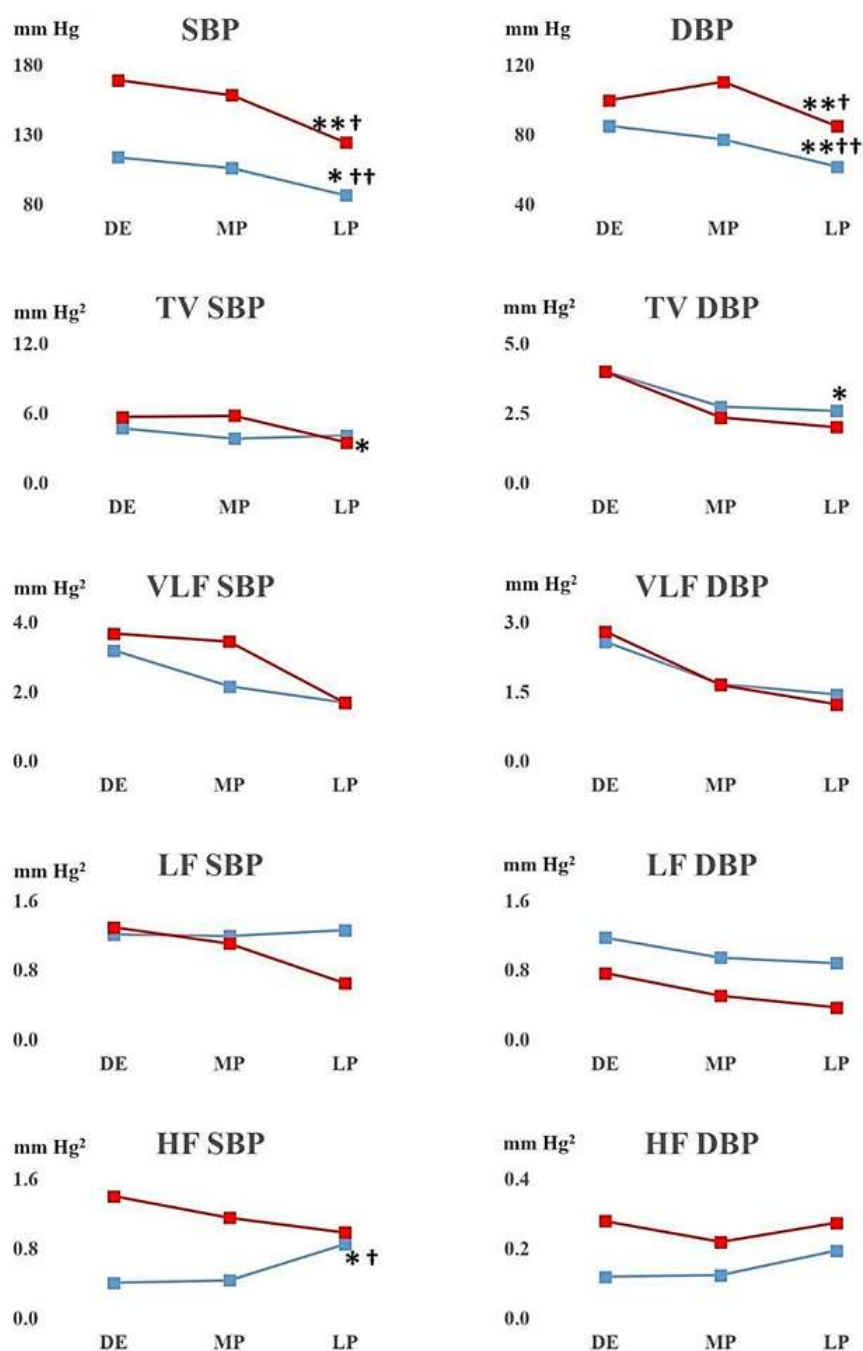
b.SHR ženke -21.5877 8.558121 10 -2.52248 0.0303 \*

Sveukupno, nije došlo do statistički značajne promene vrednosti HR-a tokom ispitivanog perioda ( $b=-1.3105$ ;  $p=0.5704$ ). Sveukupno, u posmatranom periodu, SHR ženke su imale značajno niže vrednosti HR-a u odnosu na WR ženke ( $b=-21.5877$ ;  $p=0.0303$ );  $*p < 0.05$  vs. WR u vremenu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost, standardna devijacija, medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Podaci su analizirani testom Mixed ANOVA ponovljenih merenja, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p<0.05$ . Merenje 1: diestrus; merenje 2: 10. dan gestacije; merenje 3: kasna gestacija. merenje 4: 1. postpartalni dan; merenje 5: 5. postpartalni dan;

4.2. Hemodinamski parametri i spektralni markeri kod Wistar i spontanohipertenzivnih ženki u diestrusu i tokom graviditeta

#### 4.2.1. Sistolni i dijastolni krvni pritisak, i kratkoročni varijabilitet krvnog pritiska kod Wistar i spontanohipertenzivnih ženki u diestrusu i tokom graviditeta

Bez obzira na postojanje hipertenzije kod negravidnih SHR ženki, kasna trudnoća je kod SHR-a, kao i kod WR ženki, statistički značajno smanjila vrednosti SBP-a i DBP-a u vremenu i u odnosu na diestrus. Pad SBP-a i DBP-a je bio izraženiji kod SHR ženki, sa normalizacijom vrednosti pritiska u kasnoj, terminskoj trudnoći. Redukcija SBP-a i DBP-a praćena je redukcijom ukupnog SBP i DBP varijabiliteta u vremenu. Takođe, spektralna analiza je otkrila povećanje HF SBP domena samo kod gravidnih WR-a u vremenu i u odnosu na diestrus. Trudnoća WR i SHR ženki nije uticala na zone niske i veoma niske frekvencije SBP i DBP varijabiliteta (Slika 18).

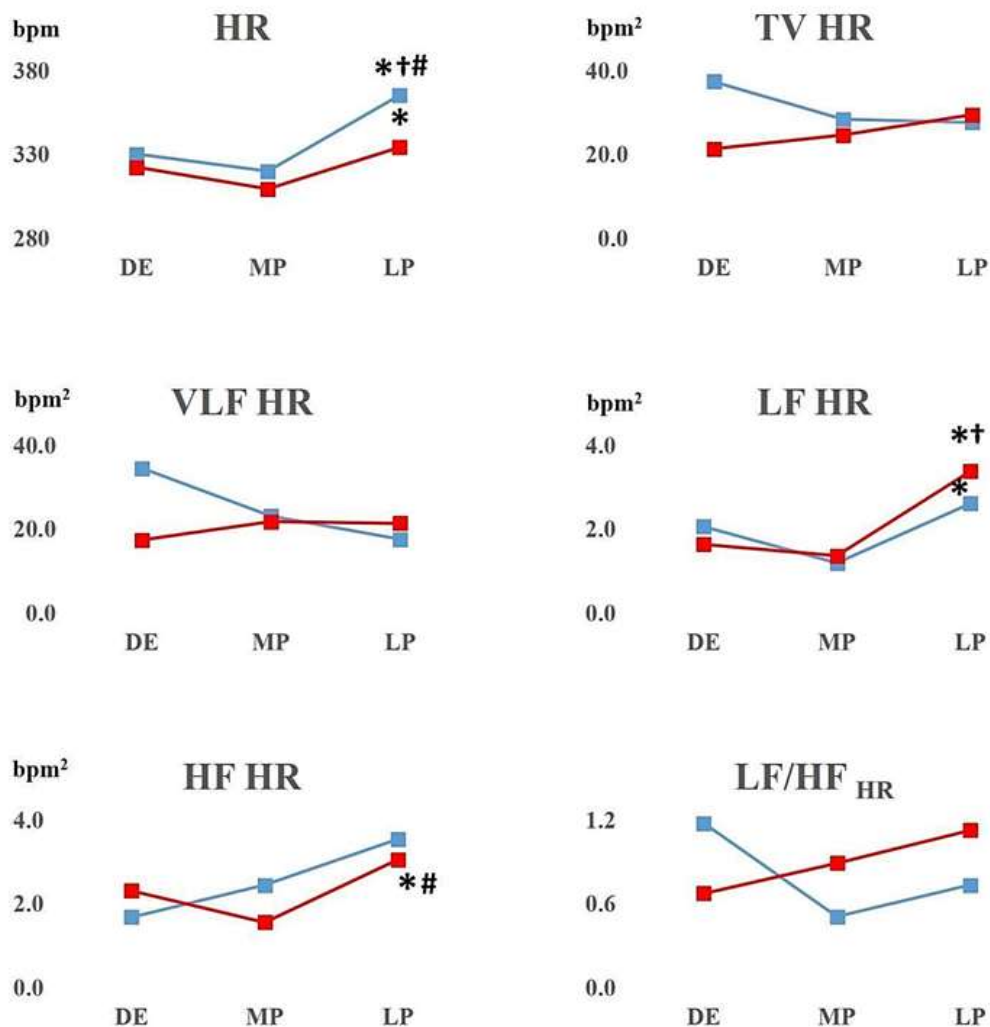


**Slika 18. SBP i DBP, kratkoročni varijabilitet krvnog pritiska kod WR-a i SHR-a.** Trudnoća izaziva značajno smanjenje SBP-a i DBP-a u obe grupe, koje je praćeno padom u totalnom varijabilitetu KP u odgovarajućim grupama. Takođe, kod WR ženki sa trudnoćom raste HF SBP u vremenu i u odnosu na diestrus. Plave linije: WR ženke pacova; crvene linije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; MP: 10. dan gestacije; LP: kasna gestacija. Podaci su analizirani primenom *The independent Friedman test-a*, a statistička značajnost je bila \* $p < 0.05$  u vremenu; \*\* $p < 0.01$  u vremenu; † $p < 0.05$  kasna gestacija vs. diestrus bazalne vrednosti; †† $p < 0.01$  kasna gestacija vs. diestrus bazalne vrednosti.

#### 4.2.2. Srčana frekvencija i kratkoročni srčani varijabilitet kod Wistar i spontanohipertenzivnih ženki u diestrusu i tokom graviditeta

Krajem trudnoće, HR statistički značajno raste kod ženki oba soja, što je praćeno porastom LF-HR zone srčanog varijabiliteta. Ovaj porast u LF-HR zoni je bio izraženiji kod SHR ženki označavajući pojačanu simpatičku srčanog mišića u vremenu i u odnosu na diestrus. Međutim, zbog istovremenog povećanja vagalno posredovane HF-HR zone u vremenu i u odnosu na diestrus, trudnoća SHR ženki nije dovela do promene LF/HF HR kao markera simpatovagalnog balansa na srce. Nije došlo ni do promene u ukupnom HR varijabilitetu, kao ni u zoni veoma niskih frekvencija HR-a u obe eksperimentalne grupe (**Slika 19**).



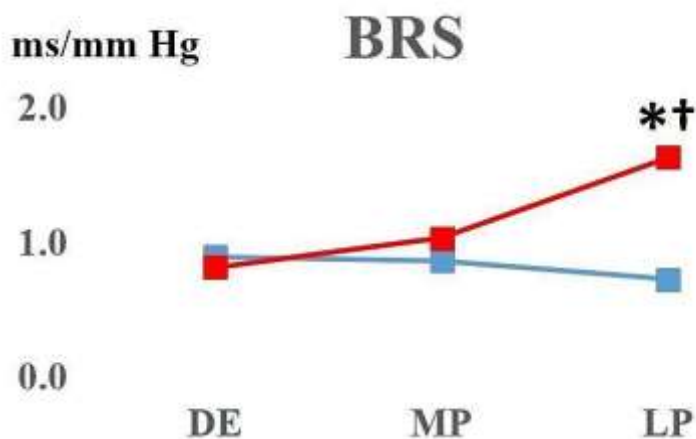


**Slika 19. HR i kratkoročni HR varijabilitet kod WR-a i SHR-a.** Tokom trudnoće postoji porast HR-a kod ženki oba soja. Kod SHR ženki trudnoća dovodi do statistički značajnog povećanja LF i HF HR varijabiliteta, ne menjajući LF/HF HR indeks. Plave linije: WR ženke pacova; crvene linije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; MP: 10. dan gestacije; LP: kasna gestacija. Podaci su analizirani primenom *The independent Friedman test-a*, a statistička značajnost je bila \* $p < 0.05$  u vremenu; \*\* $p < 0.01$  u vremenu; † $p < 0.05$  kasna gestacija vs. diestrus bazalne vrednosti; #  $p < 0.05$  kasna gestacija vs. 10. dan gestacije.

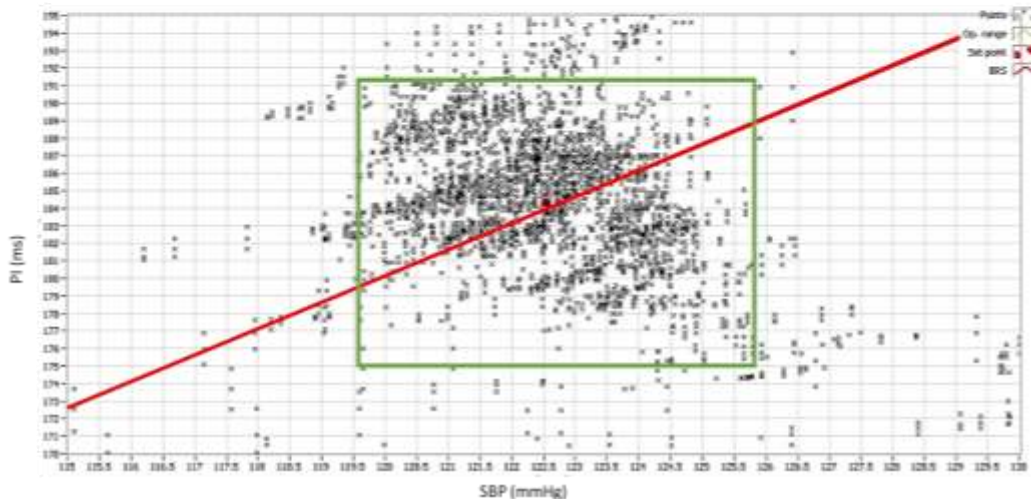
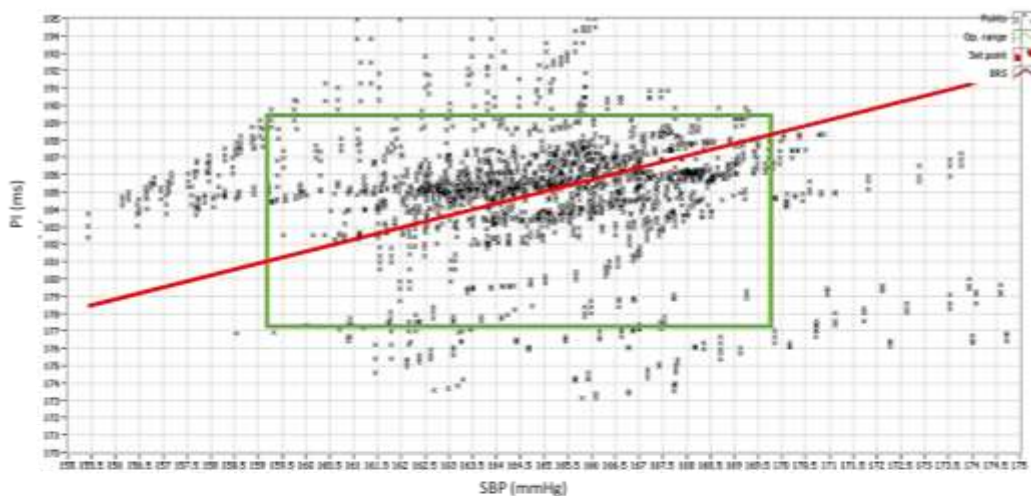
### 4.3. Parametri baroreceptorskog refleksa u diestrusu i tokom graviditeta

#### 4.3.1 Senzitivnost baroreceptorskog refleksa

Trudnoća WR ženki nije uticala na senzitivnost baroreceptorskog refleksa. S druge strane, kod SHR ženki BRS značajno raste krajem trudnoće u odnosu na diestrus vrednosti (**Slika 20 i 21**).



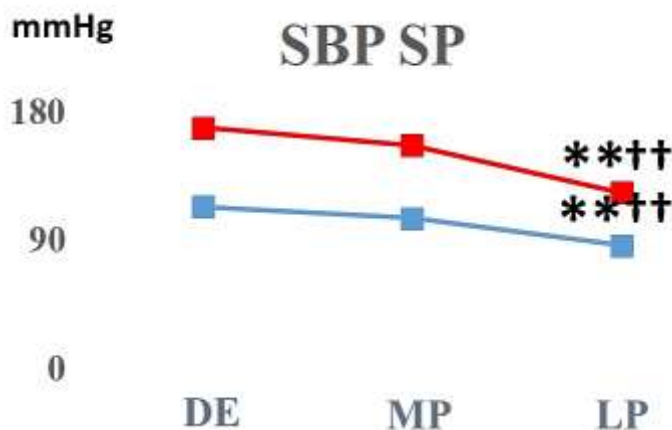
**Slika 20. BRS kod WR i SHR ženki pacova.** Kod SHR ženki, krajem trudnoće dolazi do porasta BRS. Plava linija: WR ženke pacova; crvena linije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; MP: 10. dan gestacije; LP: kasna gestacija. Podaci su analizirani primenom *The independent Friedman test-a*, a statistička značajnost je bila \* $p < 0.05$  u vremenu; † $p < 0.05$  kasna gestacija vs. diestrus bazalne vrednosti.



**Slika 21. BRS SHR ženke pacova u diestrusu (gornja slika) i 21. dana gestacije (donja slika).** Primetno je povećanje nagiba krive, odnosno porast sBRS na slici desno (21. dan gestacije). Originalni zapis, BP Complete.

#### 4.3.2. Težište rada baroreceptorskog refleksa

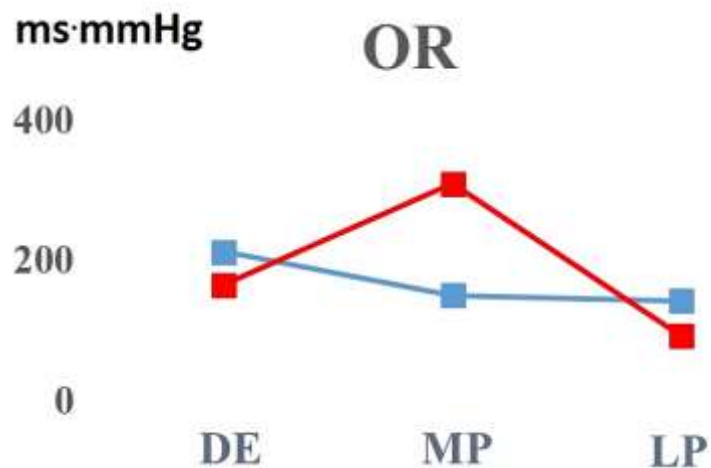
Tokom trudnoće u obe grupe životinja, došlo je do pomeranja težišta rada BRR-a ka nižim vrednostima SBP-a u vremenu i u odnosu na diestrus vrednosti (**Slika 22**).



**Slika 22. Težište rada SBP-a WR i SHR ženki tokom trudnoće.** Trudnoća kod SHR i WR ženki dovela je do pomeranja težišta rada ka nižim vrednostima SBP-a. Plava linija: WR ženke pacova; crvena linije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; MP: 10. dan gestacije; LP: kasna gestacija. Podaci su analizirani primenom *The independent Friedman test-a*, a statistička značajnost je bila \*\*p < 0.01 u vremenu; ††p < 0.01 kasna gestacija vs. diestrus bazalne vrednosti.

#### 4.3.3. Opseg delovanja baroreceptorskog refleksa

Opseg delovanja BRR-a nije se menjao u ispitivanom periodu tni kod SHR-ova ni kod WR-a (**Slika 23**).

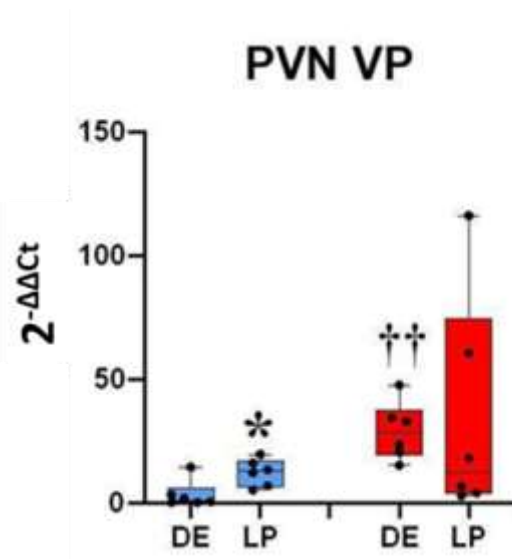


**Slika 23. Radni opseg delovanja barorefleksa kod WR i SHR ženki u trudnoći.** Trudnoća kod SHR i WR ženki nije uticala na radni opseg delovanja BRR-a-. Plava linija: WR ženke pacova; crvena linije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; MP: 10. dan gestacije; LP: kasna gestacija.

4.4. Ekspresija vazopresina i vazopresinskih receptora u paraventrikularnom jedru i supraoptičkom jedru Wistar i spontano hipertenzivnih ženki pacova u diestrusu i kasnoj gestaciji

4.4.1. Genska ekspresija vazopresina u paraventrikularnom jedru kod Wistar ženki i ženki spontano hipertenzivnih pacova

Diestrus SHR ženke imaju povećane vrednosti ekspresije gena za VP-a u PVN-u u poređenju sa WR ženkama pod istim uslovima. Visoka vrednost genske ekspresije VP se održava i tokom kasne gestacije SHR ženki. Kod WR ženki sa trudnoćom raste nivo genske ekspresije VP-a u poređenju sa diestrus vrednostima. Ovakva dinamika promena ekspresije VP-a rezultuje izjednačavanjem nivoa ekspresije VP-a u PVN-u između ženki u kasnoj trudnoći WR-a i SHR-ova (**Slika 24**).

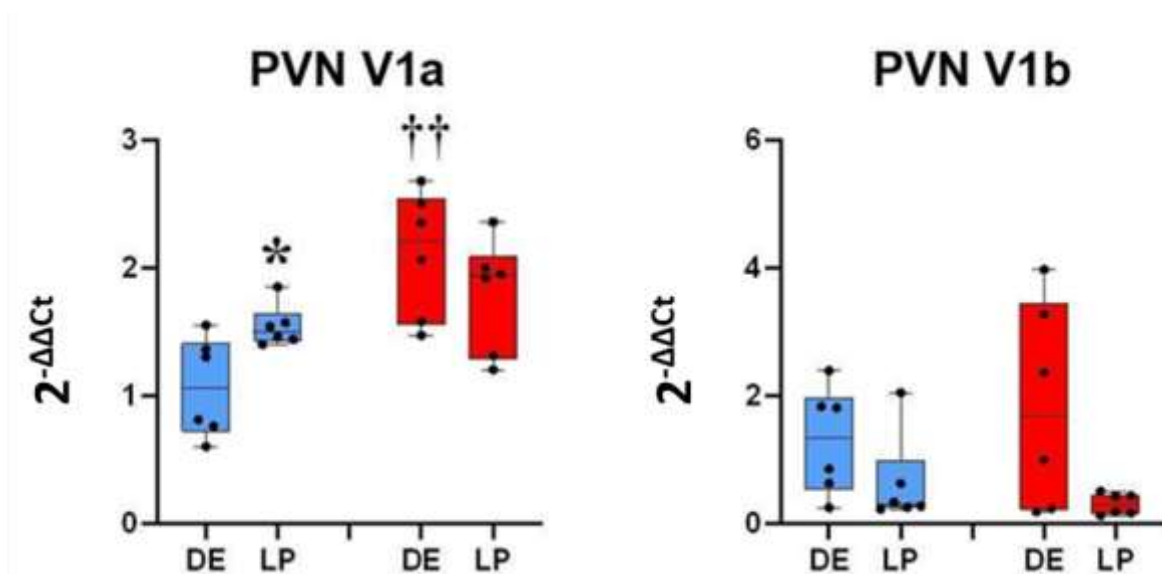


**Slika 24. Stepen promene ekspresije gena za VP u PVN-u kod WR i SHR ženki u diestrusu i kasnoj gestaciji.** Diestrus SHR ženke imaju pojačanu transkripciju iRNK-a za VP u odnosu na diestrus WR-e. Visok nivo aktivnosti gena za VP se zadržava i tokom kasne gestacije. Kod WR ženki u kasnoj trudnoći postoji statistički značajno povećanje ekspresije gena za VP u odnosu na diestrus WR kontrolu. Rezultati su prikazani kao medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Tačke predstavljaju pojedinačne vrednosti. Podaci su analizirani testom *Kruskal Wallis, post hoc Mann Whitney test*, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Plave kutije: WR ženke pacova; crvene kutije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; LP: kasna gestacija; statističke značajnosti su \* $p < 0.05$  vs. diestrus; †† $p < 0.01$  vs. WR odgovarajuća kontrola.

#### 4.4.2. Genska ekspresija vazopresinskih receptora u paraventrikularnom jedru kod Wistar ženki i ženki spontano hipertenzivnih pacova

U diestrusu, SHR ženke su pokazale povišenu ekspresiju gena V1aR u PVN-u u poređenju sa WR kontrolama, i nivo ekspresije se nije menjao tokom gestacije. U kasnoj gestaciji, ekspresija gena za V1a receptora u PVN-u povećana je kod WR-a u odnosu na ekspresiju WR-a žrtvovanih u diestrusu. Kasnu gestaciju odlučuje uporedivi nivoi ekspresije V1aR između dva soja.

Ne postoji statistički značajna razlika u nivoima iRNK-a za V1bR između diestrus i ženki u kasnoj trudnoći odgovarajućeg soja, kao ni između ženki dva soja (**Slika 25**).

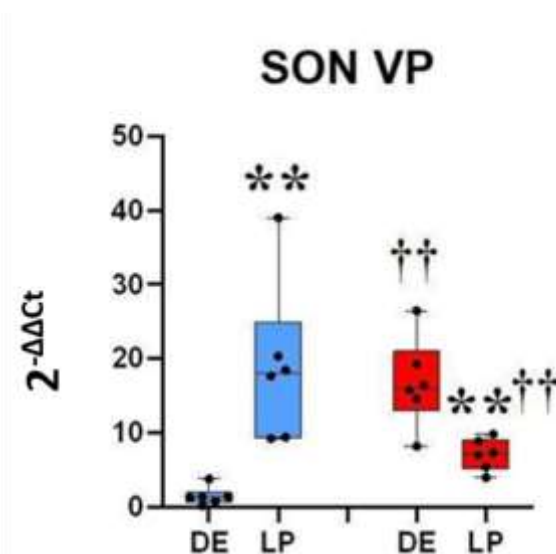


Slika

25. Stepen promene ekspresije gena za receptore VP-a u PVN-u kod WR i SHR ženki u diestrusu i kasnoj gestaciji. Diestrus SHR ženke imaju pojačanu transkripciju iRNK-a za V1aR u PVN-u u odnosu na diestrus WR-e. Kod SHR ženki nema promene nivoa ekspresije V1aR u kasnoj gestaciji. Kod WR ženki u kasnoj trudnoći postoji statistički značajno povećanje ekspresije gena za V1aR u odnosu na diestrus WR kontrolu. Rezultati su prikazani kao medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Tačke predstavljaju pojedinačne vrednosti. Podaci su analizirani testom *Kruskal Wallis, post hoc Mann Whitney test*, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Plave kutije: WR ženke pacova; crvene kutije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; LP: kasna gestacija; statističke značajnosti su  $*p < 0.05$  vs. diestrus;  $\dagger\dagger p < 0.01$  vs. WR odgovarajuća kontrola.

#### 4.4.3. Genska ekspresija vazopresina u supraoptičkom jedru kod Wistar ženki i ženki spontano hipertenzivnih pacova

RT-PCR analiza je pokazala povećan nivo iRNK za VP u SON-u diestrus SHR-ova, u odnosu na diestrus WR ženke. Trudnoća je različito uticala na gensku ekspresiju za VP kod sojeva: ekspresija VP gena je povećana kod ženki u kasnoj trudnoći WR pacova, a smanjena kod SHR ženki (Slika 26).



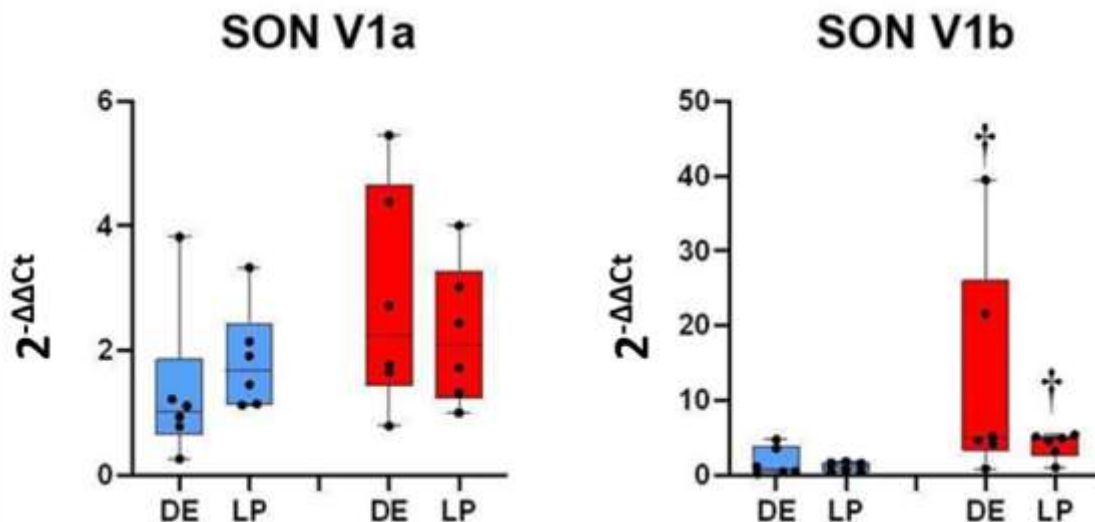
**Slika 26. Stepen promene ekspresije gena za VP u SON-u kod WR i SHR ženki u diestrusu i kasnoj gestaciji.** U WR grupi prisutno je gestacijski izazvano izrazito povećanje ekspresije gena za VP u SON-u. Obrnuto, trudnoća je kod SHR ženki značajno smanjila ekspresiju gena za VP u SON-u. Rezultati su prikazani kao medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Tačke predstavljaju pojedinačne vrednosti. Podaci su analizirani testom *Kruskal Wallis, post hoc Mann Whitney test*, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Plave kutije: WR ženke pacova; crvene kutije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; LP: kasna gestacija; statističke značajnosti su  $**p < 0.01$  vs. diestrus;  $††p < 0.01$  vs. WR odgovarajuća kontrola.

#### 4.4.4. Genska ekspresija vazopresinskih receptora u supraoptičkom jedru kod Wistar ženki i ženki spontano hipertenzivnih pacova

Poređenjem genske ekspresije V1bR u SON-u pacova utvrđeno je da je nivo iRNK za V1bR značajno viši kod SHR-ova i u diestrusu i u kasnoj gestaciji u odnosu na WR pod istim okolnostima. Trudnoća nije uticala na ekspresiju gena za V1bR u SON-u kod oba soja, WR-a i SHR-ova.

Analiza nivoa iRNK za V1aR u SON-u WR-a i SHR-ova nije pokazala značajne razlike ni u diestrusu ni u kasnoj gestaciji između ova dva soja, niti je gestacija menjala nivo iRNK u odnosu na diestrus nivoe (**Slika 27**).



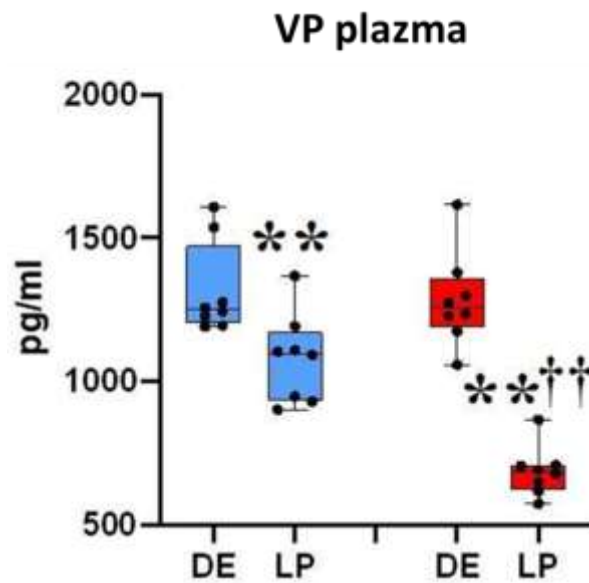


**Slika 27. Stepen promene ekspresije gena za receptore VP-a u SON-u kod WR i SHR ženki u diestrusu i kasnoj gestaciji.** SHR ženke imaju veći nivo V1bR iRNK u diestrusu i u kasnoj gestaciji u poređenju sa WR kontrolama. Trudnoća ne utiče na ekspresiju gena za V1aR i V1bR u SON-u WR-a i SHR-ova. Rezultati su prikazani kao medijana, minimalna i maksimalna vrednost 6 jedinica posmatranja. Tačke predstavljaju pojedinačne vrednosti. Podaci su analizirani testom *Kruskal Wallis, post hoc Mann Whitney test*, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Plave kutije: WR ženke pacova; crvene kutije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; LP: kasna gestacija; statističke značajnosti su † $p < 0.05$  vs. diestrus.

#### 4.5. Koncentracija vazopresina u plazmi Wistar i spontano hipertenzivnih ženki pacova u diestrusu i kasnoj gestaciji

Koncentracija VP u plazmi izmerene u bazalnim uslovima, odnosno u diestrus fazi ciklusa ženki oba soja su bile međusobno uporedive. S druge strane merenje je pokazalo da gravidne SHR ženke imaju znatno niže vrednosti cirkulišućeg VP-a nego WR ženke pod istim uslovima. Na osnovu dobijenih koncentracija VP-a u plazmi gravidnih ženki utvrđen je gestacijski indukovani pad VP kod ženki oba soja, sa većim padom kod SHR ženki (**Slika 28**).





**Slika 28. Koncentracija VP u plazmi WR i SHR ženki pacova u diestrusu i kasnoj gestaciji.** Primećeno je gestacijski izazvano značajno smanjenje nivoa VP u plazmi kod oba soja, pri čemu su promene bile izraženije kod ženki SHR soja. Gravidne SHR ženke imaju niže vrednosti VP u plazmi u odnosu na WR ženke pod istim uslovima. Rezultati su prikazani kao medijana, minimalna i maksimalna vrednost 8 jedinica posmatranja. Tačke predstavljaju pojedinačne vrednosti. Podaci su analizirani testom *Kruskal Wallis, post hoc Mann Whitney test*, a za statističku značajnost uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Plave kutije: WR ženke pacova; crvene kutije: SHR ženke pacova; DE: diestrus; LP: kasna gestacija; statističke značajnosti su \* $p < 0.05$  vs. diestrus; \*\* $p < 0.01$  vs. diestrus; † $p < 0.05$  v.s WR; †† $p < 0.01$  vs. WR.

## 5. DISKUSIJA

Ovo istraživanje je po prvi put pokazalo različitu adaptaciju autonomne kontrole kardiovaskularnog sistema u trudnoći između ženki dva soja, odnosno da kod SHR ženki u kasnoj trudnoći postoji porast BRS i promena na srčanom varijabilitetu koje nisu prisutne u gestaciji WR ženki. Takođe, rezultati ove studije su po prvi put pokazali da trudnoća različito utiče na ekspresiju gena za VP i V1aR u PVN-u WR i SHR ženki, kao i da diestrus i SHR ženke u kasnoj trudnoći pojačano ekspimiraju gen za V1bR u SON-u u odnosu na odgovarajuće WR kontrole.

Trudnoću karakteriše smanjenje SBP i DBP i refleksno uvećanje HR-a (Mahendru i sar, 2014). Poznato je da SHR ženke imaju bazalno više pritiske i nižu frekvencu u odnosu na normotenzivnu kontrolu pre trudnoće, što smo mi i verifikovali u našim eksperimentima. Ova razlika u pritisku se održala i tokom gestacije i po završetku trudnoće. Sa uspostavljanjem trudnoće oba soja (WR i SHR) karakterišu se značajnim smanjenjem srednjeg arterijskog pritiska uprkos povećanom volumenu plazme. Ovaj fenomen gestacijski indukovano pada BP-a u kasnoj gestaciji praćen je kompenzantornim povećanjem HR-a u obe vrste i rezultat je smanjenog perifernog vaskularnog otpora usled pojačane vazodilatacije i vaskularne neresponsivnosti na različite vazokonstriktore (Sanghavi i Rutherford 2014). Ranija istraživanja su pokazala da trudnoća kod SHR-a podstiče smanjenje BP-a koje je povezano sa povećanom dostupnošću NO, smanjenom generacijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i nižom ekspresijom NAD(P)H oksidaznih subjedinica (NOX 1, 2 i 4) u aortnim arterijama (Troiano i sar, 2021; Zancheta i sar, 2015). Pored toga, dalje praćenje hemodinamskih parametara prvog i petog dana po partusu, pokazalo je potpunu reverziju vrednosti SBP-a, DBP-a i HR-a petog postapartalnog dana, potvrđujući da su promene SBP, DBP i HR bile rezultat adaptacije organizma majke na trudnoću. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno izvedenim studijama drugih autora (Teli, Bagali, i Ghatanatti 2016; Wang i sar, 2021). Poznato je da se kod žena prolazni pad pritiska beleži na početku (uglavnom) jedноплодне trudnoće (Teufel i sar, 2021), dok se kod ženki pacova registruje tek krajem višeploдне trudnoće u dvorogoj materici. I pored ove činjenice ženka pacova je prihvaćena kao adekvatan model za studije kardiovaskularne i autonomne adaptacije na trudnoću. Primati se zbog sličnosti u placentaciji i visokog stepena homologije genoma sa ljudima koriste kao najbolji model izbora u eksperimentalnim ispitivanjima kardiovaskularnih promena u trudnoći. Međutim, ogledi na primatima su povezani sa velikim troškovima, zakonskim i etičkim ograničenjima (Tarantal, Hartigan-O'Connor, i Noctor 2022; Carter 2020). Poznato je da se ovulacija kod ženke pacova ponavlja spontano svakih 4-5 dana, koliko i traje polni ciklus. Lutealna faza je kratka, dok graviditet traje 21-23 dana, te je zbog uštede vremena ženka pacova, kao i niže cene i manjih troškova gajenja u vivarijumu veoma pogodna za studije reprodukcije (Amann 1982; Grümmer 2006; Walters, Allan, i Handelsman 2012; Jawerbaum i White 2010). Pored toga, ženke pacova prolaze kroz različite adaptivne promene kardiovaskularnog sistema u toku trudnoće koje ipak većinski koreliraju sa promenama kod trudnica. Kod pacova je moguće i razvijanje stanja pod nazivom - pseudograviditet koje omogućava proučavanje efekata trudnoće na organizam ženke bez prisustva fetusa i posteljice (Hardy 1970). S druge strane, laboratorijski pacov je pogodan model za kardiovaskularna istraživanja zbog dobro proučene neurogene regulacije krvnog pritiska.

Dodatno, u eksperimentalnim studijama najčešće korišćen model za humanu esencijalnu hipertenziju je SHR. SHR predstavljaju soj pacova nastao selektivnim inbridingom Wistar Kyoto (WKY) albino pacova sa povišenim krvnim pritiskom (Okamoto i Aoki 1963). Po mnogo čemu, SHR ima sličnosti sa humanom hipertenzijom: značajna genetska komponenta kod oba, sličan tok bolesti sa oštećenjem perifernih organa, simpatička hiperaktivnost i povećana aktivnost sistema renin angiotenzin, kao i velika uloga stresa i drugih faktora rizika za nastanak hipertenzije. SHR imaju spontani razvoj povišene vrednosti krvnog pritiska, povećan ukupni periferni vaskularni otpor bez povećanja volumena cirkulišuće tečnosti, oštećenu funkciju arterijskog barorefleksa, ali očuvani odgovor na primenu antihipertenzivne terapije. Pokazan je i značaj ROS-a i fizičke inaktivnosti u razvoju hipertenzije kod ovog soja (Kawakami i sar, 2024). Posebno je važno istaći da i kod SHR pacova, kao i kod čoveka, postoje polne razlike u oboljevanju od hipertenzije (niža stopa oboljevanja ženke u reproduktivnom periodu) (Pinto, Paul, i Ganten 1998; Lerman i sar, 2019; Reckelhoff, Romero, i Yanes Cardozo 2019).

Osim dugoročnih promena, BP i HR pokazuju i varijacije kratkoročnog karaktera. Varijabilitet krvnog pritiska (BPV) predstavlja neprekidne i dinamičke fluktuacije vrednosti krvnog pritiska tokom života, složenog ali i nepotpuno ispitanog porekla nastanka. BPV je rezultat aktivacije regulatornih mehanizama u cilju održavanja homeostaze BP-a kako bi se održala optimalna perfuzija organa (Gianfranco Parati i sar, 2018). Ima klinički značaj kao nezavisni prediktivni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti, hronična oboljenja bubrega, pad kognitivnih funkcija i mentalne bolesti gde porast BPV korelira sa lošijom prognozom (Palatini i sar, 2014; Mehlum i sar, 2018; Sheikh i sar, 2023). Promena u sistolnom BPV prvenstveno odražava vaskularnu krutost i starenje, dok promena dijastolnog BPV odražava oštećenu autonomnu funkciju sa povećanom simpatičkom aktivnošću i endotelnom disfunkcijom (Bilo i Parati 2018). U ovom eksperimentu smanjenje sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska kod WR-a i SHR-a krajem trudnoće praćeno je smanjenjem ukupnog varijabiliteta SBP-a i DBP-a, sugerišući mogućnost smanjenja krutosti krvnih sudova i poboljšanja autonomne i endotelne funkcije.

TV BP spektar se sastoji iz tri komponente: VLF, LF i HF. VLF komponenta je složeno regulisana i zavisi od termoregulatornih mehanizama, od miogenih mehanizama, od fizičke aktivnosti, od efekata sistema renin-angiotenzin, simpatičkih uticaja, VP, vazodilatatora poput bradikina i NO (G. Parati i sar, 1995; Julien, Saul, i Parati 2008; Japundzic-Zigon 1998; Japundzić-Zigon, Milutinović, i Jovanović 2004; Stauss i Persson 2000). Dakle, prema našim rezultatima, ovo smanjenje krvnog pritiska i TV BP primećeno kod WR-a i SHR-a se uglavnom dešava zbog smanjenja u VLF opsegu, jer on i dominantno čini TV BP i može se pripisati povećanoj sintezi brojnih vazodilatatora kao što su bradikinin i NO, promeni nivoa VP u plazmi, porastu ekspresije vazodilatatornih AT2 receptora i/ili neosetljivosti krvnih sudova na vazokonstriktore što je i okosnica vazodilatatornih promena u trudnoći..

Poreklo LF zone varijabiliteta krvnog pritiska rezultat je povećanog tonusa simpatičkog nervnog sistema (Japundzic i sar, 1990; Japundzic-Zigon 1998). Iako trudnoća izaziva simpatičku hiperaktivnost, LF komponenta krvnog pritiska ne može je odraziti zbog oštećene neurovaskularne transdukcije, pa ni nema statističkih značajnih promena LF SBP u kasnoj gestaciji WR i SHR ženki.

Povećanje HF SBP zone TV BP u trudnoći je primećeno samo kod ženki WR soja, što je u skladu sa rezultatima druge istraživačke grupe (Slangen i sar, 1997). HF SBP zona nastaje

preraspodelom krvi u velikim torakalnim sudovima zbog poremećaja hemodinamike velikih intratorakalnih krvnih sudova usled disanja. Naime, tokom inspirijuma javlja se negativan intratorakalni pritisak koji rasteže zidove torakalnih vena i smanjuje venski priliv u srce; takođe rasteže i zidove aorte, što posledično smanjuje arterijski krvni pritisak. Po završetku inspirijuma, zidovi krvnih sudova se vraćaju u pređašnje stanje i arterijski krvni pritisak se oporavlja (Elghozi, Laude, i Girard 1991; Triedman i Saul 1994). HF SBP komponenta spektra je regulisana disanjem i potencira se u stanjima sa gubitkom krvi i/ili jakom vazodilatacijom. HF zona varijabilnosti SBP može biti povećana usled značajne vazodilatacije (Japundzic i sar, 1990) ili promena u obrascu disanja (D. Laude i sar, 1995). Pošto WR ženke u našim eksperimentima nisu pokazale nikakve promene u obrascu disanja, označenog HF maks vrednostima, promena u HF SBP je verovatno posledica smanjenja efektivnog arterijskog pritiska u trudnoći, odnosno posledica je nedovoljne ispunjenosti arterijskih krvnih sudova, jer vazodilatacija prevazilazi hipervolemiju.

Naše istraživanje ukazuje da su promene kardiovaskularnog varijabiliteta krajem trudnoće više izražene kod SHR ženki u odnosu na WR kontrole, i da dominiraju promene srčanog varijabiliteta u odnosu na promene varijabiliteta krvnog pritiska kod istih životinja što je verovatno posledica oštećenja neurovaskularne transdukcije. HR predstavlja broj otkucaja srca u minutu, dok je HRV definisan kao mera varijacije u vremenu između uzastopnih srčanih otkucaja, odnosno mera varijacije interbitnih intervala (Engl. *interbeat intervals* - IBIs) (Shaffer i Ginsberg 2017). HRV je rezultat regulacije otkucaja srca i srčanog ritma od strane obe simpatičke i parasimpatičke grane ANS-a, te su promene u HRV indirektni pokazatelji promene u aktivnosti, odnosno neravnoteže ANS-a (Pumprla i sar, 2002; Draghici i Taylor 2016). Iz tog razloga HRV ima važan klinički značaj, jer se može koristiti kao indikator rizika za srčane komplikacije u opštoj populaciji kardiovaskularnih pacijenta (Alberto Malliani 2005; Sessa i sar, 2018), ishemične srčane komplikacije u zdravoj i hipertenzivnoj trudnoći (Sliwa i Böhm 2014; Mogos i sar, 2018), pa čak i kao indikator individualne kardiovaskularne kondicije (Draghici i Taylor 2016). Iz HRV izveden je TV HR spektar sa svoje tri komponente: VLF-, LF- i HF HR VLF snaga spektra je komponenta najsloženije regulacije i nastaje kao rezultat delovanja brojnih mehanizama (Shaffer i Ginsberg 2017). LF snaga u frekventnom domenu odražava simpatičko opterećenje na srce, dok HF snaga odražava parasimpatički uticaj na srčanu frekvenciju (Japundzic i sar, 1990).

Naša SHR eksperimentalna grupa nije imala statistički značajne promene u TV HR i VLF zoni oscilacija krajem trudnoće, ali je zato zabeležen porast u LF i HF zoni HRV. Povećani LF HR opseg prezentuje povećanu simpatičku reaktivnost koja je odlika i hronične hipertenzije naših SHR ženki i adaptacije ANS-a na trudnoću, dok visok nivo genske ekspresije VP i V1a u PVN primećen kod SHR ženki pre i krajem gestacije sugerišu da ta simpatička hiperaktivnost postoji pre i održava se i tokom trudnoće. Istovremeno, na kraju trudnoće postoji i porast HF HR opsega, odnosno povećan je i parasimpatički uticaj na srce. Pored toga, kasna trudnoća kod SHR ženki otkrila je i povećanje BRS-a. Postoji povezanost BP, HR i tonusa krvnih sudova, gde promena u BP, menja aktivnost baroreceptora, a samim tim se menja HR i vaskularni tonus (Vaschillo i sar, 2002). Takođe, BRS preko respiratorne sinus aritmije moduliše HRV (Karemaker 2009). Moguće je da je detektovani porast BRS rezultirao povećanim parasimpatičkim uplivom ka srcu i posledično povećanim HR HF opsegom. Poznato je da je povećanje vagalnih uticaja na srce korisno u zaštiti srca od prekomerne simpatičke stimulacije

i ta zaštita se zasniva na stimulaciji sinteze NO u komorama (Brack, Winter, i Ng 2013). Kod naših gravidnih SHR ženki ANS je najverovatnije u balansu jer je LF/HF HR nepromenjen. Istovremeno povećanje i LF i HF zone HR uz nepromenjeni LF/HF indeks je posledica istovremene ko-aktivacije obe, simpatičke i parasimpatičke grane ANS-a u sklopu adaptacije SHR ženke na trudnoću. Rad srca je efikasniji kada su obe autonomne grane ANS-a istovremeno aktivne (Paton i sar, 2005).

WR ženke iz naše studije imaju porast LF HR zone 20. dana gestacije u odnosu na diestrus vrednosti, što uz istovremeni nalaz povećanja ekspresije gena za VP i V1a u PVN-a, ide u prilog postojanja pojačane simpatičke aktivacije kao fiziološkog stanja u trudnoći.

Normotenzivna trudnoća je stanje fiziološke simpatičke hiperaktivnosti udružena sa depresijom barorefleksne funkcije i oštećenjem neurovaskularne transdukcije (Reyes i sar, 2018). Steinback i saradnici su pretpostavili da je poremećena transdukcija pozitivna adaptacija koja štiti trudnice od kardiovaskularnih posledica simpatičke hiperaktivnosti (Steinback i sar, 2019). Bez obzira na cilj adaptacije poznato je da poremećaj BRS može dovesti do fluktuacije krvnog pritiska, hipertenzivne krize i ortostatske netolerancije (Ketch i sar, 2002). Takođe, trudnice su usled oštećenja funkcije BRR-a sklone komplikacijama, kao što je po život opasna peripartalna hemoragija (Panchal, Arria, i Labhsetwar 2001), a trudnice sa hroničnom hipertenzijom su dodatno opterećene rizikom od kardiovaskularnih komplikacija zbog povišenog pritiska (Lindheimer, Taler, i Cunningham 2010).

Analizom dobijenih parametara baroreceptorskog refleksa u diestrusu i tokom graviditeta dobijene su dalje potvrde da postoji razlika u autonomnoj adaptaciji u normotenzivnoj i hroničnoj hipertenzivnoj trudnoći. Kod SHR ženki beležimo porast BRS, za razliku od WR ženki kod kojih postoji trend pada BRS-a, ali bez statističke značajnosti. Kod ženki oba soja pomera se težište rada BRR-a ka nižim vrednostima pritiska, dok radni opseg ostaje nepromenjen. Oštećenje funkcije barorefleksa zabeleženo je kod normotenzivnih trudnica (Blake i sar, 2000; Visontai i sar, 2002; Voss i sar, 2000; Garg i sar, 2020), kod ženki pacova (Brooks i sar, 2010) i drugih vrsta sisara (Brooks, Dampney, i Heesch 2010). Nasuprot istraživanjima BRS u normotenzivnoj trudnoći, svega nekoliko radova razmatra autonomno prilagođavanje kardiovaskularne kontrole u hroničnoj hipertenzivnoj trudnoći i izveštava o nepromenjenom BRS (Natali i sar, 2022) kod spontano hipertenzivnih gravidnih pacova ili smanjenom BRS kod hroničnih hipertenzivnih žena (Baumert i sar, 2004).

Ideja o poboljšanom BRS nije samo na nivou hipoteze već ima i istraživačku podršku u eksperimentima koje su sprovedeli Natali i saradnici. Oni su pretpostavili da trudnoća može poboljšati BRS kod SHR-a na osnovu prethodnih istraživanja, ali nisu uspeli da dokažu (Natali i sar, 2022). Ipak, drugi rezultati ove grupe sugerišu da trudnoća poboljšava oštećenu simpatičku vazomotornu modulaciju i parasimpatičku srčanu modulaciju kod SHR-a.

Razlike u rezultatima navednih studija može biti posledica razlike u vrsti (žene vs. pacov, korišćenja ženki različitih sojeva, u različitoj fazi ciklusa estrusa (estrus vs diestrus), korišćenja drugačije metode (invazivna metoda kod pacova vs. neinvazivna metoda kod žena, kanila vs telemetrija) ili primene različitih eksperimentalnih protokola (registrovanje signala isključivo danju ili noću, obrada signala različite dužine i slično). Goldman i sar,, pokazali su uticaj polnog ciklusa na BRS kod SD ženki (R. K. Goldman i sar, 2009). Prednosti telemetrije u odnosu na

kanulaciju su dobro dokumentovane, kao što su potpuni oporavak ženki (Takezawa i sar, 1994) prednosti dugoročnog i kontinuiranog registrovanja (Savić i sar, 2020) i eliminacija pridruženih efekata stresa (Braga i Prabhakar 2009).

Povećana barorefleksna senzitivnost (BRS) je često povezana sa povišenim nivoima VP u plazmi i naknadnim pojačanjem barorefleksnog odgovora na nivou *area postrema* (Hasser i Bishop 1990) Pošto su nivoi VP bili smanjeni u ovoj studiji, ne može se uspostaviti takva veza sa funkcijom barorefleksa. Ipak, mogu biti uključeni drugi adaptivni mehanizmi. U kontekstu rezultata dobijenih u ovoj studiji i s obzirom na centralnu ekspresiju VP, treba napomenuti da SON može slati neuronske projekcije prema vagalnim jezgrima uključenim u barorefleksnu povratnu spregu (Wang i sar, 2002; Lu i sar, 2011). Pokazano je da VP inhibira parasimpatičku aktivnost u *nucleus ambiguus* (Wang i sar, 2002). S obzirom na iscrpljenost VP zaliha u SON na kraju trudnoće kod SHR, ovo bi moglo dovesti do dezinhibicije vagalnog uticaja na srce, posredujući moguću kardioprotekciju (Paton i sar, 2005; Dyavanapalli i sar, 2016; He i sar, 2015).

Uprkos diskutabilnoj ulozi VP u patogenezi hipertenzije (Lang i sar, 1984), uopšteno je mišljenje da i centralni i periferni VP podjednako doprinose razvoju ovog stanja (Japundžić-Žigon i sar, 2020; Johnston 1985; Crofton i sar, 1978). Sadržaj VP u mozgu kod genetičke hipertenzije je varijabilan. U Stroke prone varijanti spontano hipertenzivnih pacova (SPSHR), povećana stopa ekspresije VP u PVN-u i SON-u progredira sa razvojem hipertenzije. Štaviše, više vrednosti VP detektovane su čak i u prehipertenzivnim fazama unutar PVN-a i SON-a kod SHR u poređenju sa WKY pacovima (Van Tol i sar, 1988). Nasuprot tome, Moris i autori su u svom radu doveli u pitanje povišeni sadržaj VP u prehipertenzivnim fazama u PVN kod SHR u odnosu na normotenzivne kontrole i pokazali pad ekspresije VP sa pojavom i razvojem hipertenzije (Morris, Keller, i Sundberg 1983). Naši rezultati se slažu sa konceptom povećane aktivnosti VP sistema unutar PVN-a kod hipertenzije. SHR ženke su imale povećanu ekspresiju VP unutar PVN-a u diestrus fazi u poređenju sa WR ženkama, što ukazuje na stimulisanu sintezu peptida. Poznato je da, pored aksonalne sekrecije u cirkulaciju, VP može biti oslobođen iz some i dendrita MCNs (Ribeiro i sar, 2015; Son i sar, 2013). Ovaj intranuklearno oslobođeni VP deluje autokrino i parakrino kao neuromodulator/neurotransmitter (Ludwig i Stern 2015; Ludwig i sar, 2002). Prijavljeni su pozitivni i negativni efekti autokontrole VP. Somatodendritičko oslobađanje VP reguliše stopu okidanja MCN i može biti dodatno kontrolisan uticajem unutrašnjih i spoljašnjih stimulusa, poput osmotskog statusa krvi, volumena i pritiska (Gouzènes i sar, 1998). Glavni efektori intranuklearnog VP su V1aR i V1bR, koji su eksprimirani u značajnoj meri unutar PVN i SON (Hurbini i sar, 2002; Vaccari, Lolait, i Ostrowski 1998). Somatodendritičko oslobađanje VP unutar PVN ekscitira neurone koji se projektuju ka kičmenoj moždini aktivacijom V1aR koji se nalaze na parvocelularnim neuronima, što rezultira povećanjem tonusa simpatikusa (Son i sar, 2013). Ovo objašnjenje se slaže sa povećanom ekspresijom V1aR u PVN kod SHR primećenim u našim eksperimentima, ukazujući na autonomnu disfunkciju kod ovih životinja. Trudnoća nije izazvala nikakve promene u VP sistemu PVN kod SHR. Nema jasnog pregleda o ekspresiji VP receptora tokom trudnoće, a nekoliko studija izveštava o odsustvu promene gustine V1aR u PVN tokom trudnoće kod glodara (Ophir i sar, 2013; Savić, Murphy, i Japundžić-Žigon 2022). Ipak, normotenzivne kontrole pokazuju porast VP u PVN i SON, praćen regulacijom V1aR u PVN u kasnim fazama trudnoće, ukazujući na potencijalnu simpatičku preopterećenost (Jarvis i sar, 2012). Ovi oprečni rezultati mogu odražavati različite centralne adaptivne mehanizme tokom

trudnoće kod normotenzivnih i hipertenzivnih ispitanika. Takođe, treba uzeti u obzir da V1aR mogu biti aktivirani i od strane OT, zbog homologne strukture receptora, tako da OT može uticati na oslobađanje VP jer se njegov nivo u PVN povećava kako se približava porođaj (Ophir i sar, 2013; Savić, Murphy, i Japundžić-Žigon 2022).

Naše istraživanje je po prvi put pokazalo veći broj V1bR praćen povećanom ekspresijom VP u SON kod SHR ženki u diestrusnoj fazi u poređenju sa WR ženkama. Ekspresija V1bR kod SHR je bila povišena tokom cele trudnoće, dok su se nivoi VP u SON smanjivali za vreme trajanja gestacije. Generalno, iRNA za V1bR se manje eksprimira u različitim tkivima, ali imunohistohemijskim bojenjem SON-a je otkrivena bogata ekspresija V1bR, dok je distribucija V1aR diskretna (Vaccari, Lolait, i Ostrowski 1998). Nedavno je sugerisano da V1bR može biti glavni odgovoran za autoregulaciju vazopresinskih MCN-a u SON-u, uspostavljajući kratku povratnu spregu koja lokalno utiče na sintezu VP-a (Dayanithi, Sabatier, i Widmer 2000; Zemo i McCabe 2001). Takođe, možemo spekulirati da povećana ekspresija V1bR primećena u SON-u kod SHR ženki u našim eksperimentima može uticati na negativnu povratnu spregu koja reguliše sintezu VP.

Objavljeni podaci sugerišu da hipertenzija obično korelira sa visokim koncentracijama VP-a u plazmi. SHR i hipertenzivni pacijenti imaju povišene nivoe VP-a u plazmi i povećanu osetljivost krvnih sudova na egzogeno primenjeni VP, što korelira sa težinom kliničke slike (Johnston 1985; Mohring i sar, 1981). Pored toga, hronična stimulacija vaskularnih V1aR kod normotenzivnih životinja rezultira razvojem hipertenzije (Cowley 2000; E. Szczepanska-Sadowska i sar, 1994). Cirkulišući VP aktivira vaskularne V1aR što rezultira vazokonstrikcijom i stimuliše bubrežnu reapsorpciju vode posredovanu V2R. Ipak, VP u plazmi ima mali efekat na krvni pritisak u normalnim uslovima, dok tokom ekstremnih homeostatskih promena igra važnu ulogu (T.-A. Koshimizu i sar, 2012). Da bi cirkulišući VP izazvao detektabilno povećanje krvnog pritiska, potrebno je da njegova koncentracija znatno premaši fiziološke vrednosti (H. Koshimizu, Leiter, i Miyakawa 2012). Naši eksperimenti ukazuju o proporcionalnim nivoima VP-a u plazmi kod SHR i WR ženki tokom diestrus faze. Prema dostupnim literaturnim podacima, sadržaj VP-a u plazmi kod SHR-a bi trebao korelativno rasti sa progresijom hipertenzije, ali je patogeneza ovog stanja multifaktorska. Detektabilno povećanje cirkulišućeg VP-a primećeno je kod hipertenzivnih životinja starih 24 nedelja, dok su u ranijim uzrastima nivoi VP-a u plazmi izjednačeni kod normotenzivnih i hipertenzivnih životinja (Rascher, Weidmann, i Gross 1981). Treba uzeti u obzir da je većina literaturnih podataka zasnovana na poređenju između polova kod mužjaka, ali se uticaj polne varijable ne sme zanemariti. SHR pokazuju dobro opisane polno-specifične razlike u sadržaju VP u plazmi i promenama pritiska na VP (Crofton, Share, i Brooks 1988). Moguće objašnjenje leži u različitom sadržaju i količini gonadalnih hormona kod mužjaka i ženki.

Važna opservacija u ovoj studiji je da trudnoća smanjuje sadržaj VP-a u plazmi kod normotenzivnih i hipertenzivnih ženki, sa izraženijim smanjenjem u grupi SHR, što se suprotstavlja opštem konceptu adaptacije tokom trudnoće. Kod normotenzivnih trudnica neurohipofizna sekrecija VP-a je pojačana, što dodatno doprinosi povećanju volumena krvi (Tkachenko, Shchekochikhin, i Schrier 2014); Brunton, Arunachalam, i Russel 2008). Iako je sinteza vazodilatatornih supstanci i naknadna vazodilatacija ključna za održavanje neometane uteroplacentne cirkulacije koja kulminira hipervolemijom (Sanghavi i Rutherford 2014) naši eksperimenti ne podržavaju ulogu cirkulatornog VP-a u tome. Izgleda da je centralno povećana

sinteza VP-a na račun intranuklearnog oslobađanja, bez sistemske sekrecije. Ovo je dobro opisani fenomen od strane dva autora, Engelmana i Wotjaka (Engelmann i sar, 1999). Somatodendritička sekrecija je odvojeno regulisana od sistemske i dešava se individualno. Sadržaj vezikula koje nose VP namenjen za somatodendritičko oslobađanje se razlikuje od onih namenjenih za aksonalni transport i obogaćen je galaninom (Landry, Mager, i Wilhelm 2003). Takođe je pokazano kod gravidnih Sprague Dawley (SD) pacova da je sekrecija VP posredovana relaksinom. Ista studija je pokazala da gravidne ženke pacova imaju niže bazalne nivoe VP-a u plazmi u poređenju sa diestrus životinjama. Takođe, efekti sekrecije VP-a posredovani relaksinom se vremenom smanjuju i slabe u kasnoj fazi trudnoće. Ovo bi moglo biti dodatno objašnjenje za smanjenje nivoa VP-a koji dostižu minimum na kraju trudnoće (Parry, Poterski, i Summerlee 1994).

Nije poznato da li VP kao neurotransmiter u PVN-u i SON-u učestvuje u modulaciji presimpatičkog neuronalnog ispuštanja tokom normalne trudnoće i trudnoće povezane sa hipertenzijom. Kao što smo očekivali, kasna trudnoća je smanjila sistolni i dijastolni BP, što je praćeno refleksnim povećanjem HR-a kod obe grupe. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodno sprovedenih studija (Slangen i sar, 1997; Natali i sar, 2022) i odnose se na već pomenutu značajnu vazodilataciju i kompenzatorno povećanje simpatičke aktivnosti. Međutim, primetniji pad i normalizacija BP primećeni su kod kasno gestacionih SHR ženki. Ovi hemodinamski podaci odgovaraju nižim vrednostima VP-a merenim u plazmi hipertenzivnih životinja. Nije začuđujuće da niže koncentracije VP-a u plazmi posreduju smanjenje BP-a, jer je VP potentni tenzioni agens (Johnston 1985). Zaista, normotenzivna trudnoća se često navodi kao jedno od retkih 'zdravih' fizioloških stanja bazalne simpatičke hiperaktivnosti (Jarvis i sar, 2012) sa smanjenjem vagalnog tonusa i vagalne reaktivnosti kako trudnoća napreduje (Braeken i sar, 2015; DiPietro, Costigan, i Gurewitsch 2005). Naši rezultati koji pokazuju povećanu ekspresiju VP-a i V1aR u PVN kod normotenzivnih životinja bi objasnili porast simpatičke aktivnosti tokom trudnoće ka periferiji i medularnim jedrima uključenim u barorefleksni odgovor (Milutinović, Murphy, i Japundzić-Zigon 2006; Japundzić-Žigon i sar, 2020; Son i sar, 2013) Međutim, sBRS i autonomni spektralni markeri kod WR-a nisu bili pogođeni kasnom trudnoćom, što je takođe u skladu sa izveštajima drugih istraživačkih grupa (Slangen i sar, 1997; Natali i sar, 2022). Trudnoća je karakterisana oštećenom neurovaskularnom transdukcijom (Steinback i sar, 2019; Natali i sar, 2022), praćenom vaskularnom neosetljivošću na vazokonstriktore (Paller 1984; Gant i sar, 1973; Nisell, Hjemdahl, i Linde 1985) što podržava održivo smanjenje ukupnog perifernog otpora. Imajući to na umu, V1aR bi posredovao simpatičku stimulaciju srca, bez ili sa smanjenim vaskularnim odgovorom.



## 6. ZAKLJUČCI

- Hipertenzivne ženke u odnosu na normotenzivne kontrole imaju više vrednosti SBP i DBP, kao i niži HR pre, tokom i nakon trudnoće. U trudnoći SHR ženki dolazi do normalizacije pritiska sa porastom HR, sa postpartalnoreverzijom vrednosti SBP; DBP i HR na nivoe pre trudnoće.
- Hipertenzivne ženke ispoljavaju krajem trudnoće izražene znakove pojačane simpatičke stimulacije srca (povećana varijabilnost HR i LF-HR) i angažovanja vagalnih mehanizama (povećavanje varijabilnosti BRS i HF-HR).
- Gravidne SHR ženke imaju smanjenu ekspresiju VP u SON povezanu sa povećanom ekspresijom V1bR, nižim VP u plazmi i normalnim krvnim pritiskom tokom kasne trudnoće. WR ženke imaju povećanu ekspresiju gena za VP i V1a u PVN-u, povećan nivo ekspresije gena za VP u SON-u i nižu plazma koncentraciju VP.

**Naši podaci sugerišu razlike u centralnom vazopresinergičkom sistemu i autonomnoj modulaciji kod ženki SHR i WR soja i mogu pružiti moguće objašnjenje za mehanizam poboljšanog sBRS kod SHR ženki u kasnoj trudnoći.**

## 7. LITERATURA

1. Al-Khazraji, Baraa K., and J. Kevin Shoemaker. 2018. "The Human Cortical Autonomic Network and Volitional Exercise in Health and Disease." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme* 43 (11): 1122–30.
2. Amann, R. P. 1982. "Use of Animal Models for Detecting Specific Alterations in Reproduction." *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 2 (1): 13–26.
3. Arima, H., K. Kondo, S. Kakiya, H. Nagasaki, H. Yokoi, Y. Yambe, T. Murase, Y. Iwasaki, and Y. Oiso. 1999. "Rapid and Sensitive Vasopressin Heteronuclear RNA Responses to Changes in Plasma Osmolality." *Journal of Neuroendocrinology* 11 (5): 337–41.
4. Azar, Afaf S., and Virginia L. Brooks. 2011. "Impaired Baroreflex Gain during Pregnancy in Conscious Rats: Role of Brain Insulin." *Hypertension* 57 (2): 283–88.
5. Bajić, D., T. Lončar-Turukalo, S. Stojičić, and O. Šarenac. 2010. "Temporal Analysis of the Spontaneous Baroreceptor Reflex during Mild Emotional Stress in the Rat." *Stress*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10253890903089842>.
6. Barberis, C., and E. Tribollet. 1996. "Vasopressin and Oxytocin Receptors in the Central Nervous System." *Critical Reviews in Neurobiology* 10 (1): 119–54.
7. Baumert, M., H. Stepan, N. Wessel, and A. Voss. 2004. "Baroreflex Sensitivity, Heart Rate, and Blood Pressure Variability in Hypertensive Pregnancy Disorders." *Of Human Hypertension*. <https://www.nature.com/articles/1001730>.
8. Benarroch, Eduardo E. 2005. "Paraventricular Nucleus, Stress Response, and Cardiovascular Disease." *Clinical Autonomic Research: Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society* 15 (4): 254–63.
9. Bertinieri, G., M. di Rienzo, A. Cavallazzi, A. U. Ferrari, A. Pedotti, and G. Mancia. 1985. "A New Approach to Analysis of the Arterial Baroreflex." *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension* 3 (3): S79–81.
10. Bilo, Grzegorz, and Gianfranco Parati. 2018. "Blood Pressure Variability and Kidney Disease: Another Vicious Circle?" *Journal of Hypertension*.
11. Blake, M. J., A. Martin, B. N. Manktelow, C. Armstrong, A. W. Halligan, R. B. Panerai, and J. F. Potter. 2000. "Changes in Baroreceptor Sensitivity for Heart Rate during Normotensive Pregnancy and the Puerperium." *Clinical Science* 98 (3): 259–68.
12. Boone, Michelle, and Peter M. T. Deen. 2008. "Physiology and Pathophysiology of the Vasopressin-Regulated Renal Water Reabsorption." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 456 (6): 1005–24.
13. Bourque, Charles W. 2008. "Central Mechanisms of Osmosensation and Systemic Osmoregulation." *Nature Reviews. Neuroscience* 9 (7): 519–31.
14. Brack, Kieran E., James Winter, and G. André Ng. 2013. "Mechanisms Underlying the Autonomic Modulation of Ventricular Fibrillation Initiation--Tentative Prophylactic Properties of Vagus Nerve Stimulation on Malignant Arrhythmias in Heart Failure." *Heart Failure Reviews* 18 (4): 389–408.
15. Braeken, M. A. K. A., A. Jones, R. A. Otte, D. Widjaja, S. Van Huffel, G. J. Y. J. Monsieur, C. M. van Oirschot, and B. R. H. Van den Bergh. 2015. "Anxious Women Do

- Not Show the Expected Decrease in Cardiovascular Stress Responsiveness as Pregnancy Advances." *Biological Psychology* 111 (October): 83–89.
16. Braga, Valdir A., and Nanduri R. Prabhakar. 2009. "Refinement of Telemetry for Measuring Blood Pressure in Conscious Rats." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 48 (3): 268–71.
  17. Brooks, Virginia L., Roger A. L. Dampney, and Cheryl M. Heesch. 2010. "Pregnancy and the Endocrine Regulation of the Baroreceptor Reflex." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (2): R439–51.
  18. Brooks, Virginia L., Qi Fu, Zhigang Shi, and Cheryl M. Heesch. 2020. "Adaptations in Autonomic Nervous System Regulation in Normal and Hypertensive Pregnancy." *Handbook of Clinical Neurology* 171: 57–84.
  19. Brooks, Virginia L., Julia M. Mulvaney, Afaf S. Azar, Ding Zhao, and Robert K. Goldman. 2010. "Pregnancy Impairs Baroreflex Control of Heart Rate in Rats: Role of Insulin Sensitivity." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298 (2): R419–26.
  20. Carter, Anthony M. 2020. "Animal Models of Human Pregnancy and Placentation: Alternatives to the Mouse." *Reproduction* 160 (6): R129–43.
  21. Cassaglia, Priscila A., Sam M. Hermes, Sue A. Aicher, and Virginia L. Brooks. 2011. "Insulin Acts in the Arcuate Nucleus to Increase Lumbar Sympathetic Nerve Activity and Baroreflex Function in Rats." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 7): 1643–62.
  22. Chapman, A. B., W. T. Abraham, S. Zamudio, C. Coffin, A. Merouani, D. Young, A. Johnson, i sar, 1998. "Temporal Relationships between Hormonal and Hemodynamic Changes in Early Human Pregnancy." *Kidney International* 54 (6): 2056–63.
  23. Chatur, Safia, Sunjidatul Islam, Linn E. Moore, Roopinder K. Sandhu, Robert S. Sheldon, and Padma Kaul. 2019. "Incidence of Syncope During Pregnancy: Temporal Trends and Outcomes." *Journal of the American Heart Association* 8 (10): e011608.
  24. Cheung, Katharine L., and Richard A. Lafayette. 2013. "Renal Physiology of Pregnancy." *Advances in Chronic Kidney Disease* 20 (3): 209–14.
  25. Clapp, J. F., 3rd, and E. Capeless. 1997. "Cardiovascular Function Before, During, and after the First and Subsequent Pregnancies." *The American Journal of Cardiology* 80 (11): 1469–73.
  26. Conrad, Kirk P. 2011. "Emerging Role of Relaxin in the Maternal Adaptations to Normal Pregnancy: Implications for Preeclampsia." *Seminars in Nephrology* 31 (1): 15–32.
  27. Coote, J. H. 2005. "A Role for the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in the Autonomic Control of Heart and Kidney." *Experimental Physiology* 90 (2): 169–73.
  28. Coote, J. H., Z. Yang, S. Pyner, and J. Deering. 1998. "Control of Sympathetic Outflows by the Hypothalamic Paraventricular Nucleus." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 25 (6): 461–63.
  29. Cowley, A. W., Jr. 2000. "Control of the Renal Medullary Circulation by Vasopressin V1 and V2 Receptors in the Rat." *Experimental Physiology* 85 Spec No (March): 223S – 231S.
  30. Crofton, J. T., L. Share, and D. P. Brooks. 1988. "Pressor Responsiveness to and Secretion of Vasopressin during the Estrous Cycle." *The American Journal of Physiology* 255 (6 Pt 2): R1041–48.
  31. Crofton, J. T., L. Share, R. E. Shade, C. Allen, and D. Tarnowski. 1978. "Vasopressin in

- the Rat with Spontaneous Hypertension." *The American Journal of Physiology* 235 (4): H361-66.
32. Cunningham, E. T., Jr, M. C. Bohn, and P. E. Sawchenko. 1990. "Organization of Adrenergic Inputs to the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Hypothalamus in the Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 292 (4): 651-67.
  33. Cunningham, E. T., Jr, and P. E. Sawchenko. 1991. "Reflex Control of Magnocellular Vasopressin and Oxytocin Secretion." *Trends in Neurosciences* 14 (9): 406-11.
  34. Dampney, Roger A., Lisete C. Michelini, De-Pei Li, and Hui-Lin Pan. 2018. "Regulation of Sympathetic Vasomotor Activity by the Hypothalamic Paraventricular Nucleus in Normotensive and Hypertensive States." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 315 (5): H1200-1214.
  35. Daubert, Daisy L., Mee-Young Chung, and Virginia L. Brooks. 2007. "Insulin Resistance and Impaired Baroreflex Gain during Pregnancy." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292 (6): R2188-95.
  36. Davis, Elysia Poggi, and Angela J. Narayan. 2020. "Pregnancy as a Period of Risk, Adaptation, and Resilience for Mothers and Infants." *Development and Psychopathology* 32 (5): 1625-39.
  37. Davison, J. M., E. A. Gilmore, J. Dürr, G. L. Robertson, and M. D. Lindheimer. 1984. "Altered Osmotic Thresholds for Vasopressin Secretion and Thirst in Human Pregnancy." *The American Journal of Physiology* 246 (1 Pt 2): F105-9.
  38. Dayanithi, G., N. Sabatier, and H. Widmer. 2000. "Intracellular Calcium Signalling in Magnocellular Neurones of the Rat Supraoptic Nucleus: Understanding the Autoregulatory Mechanisms." *Experimental Physiology* 85 Spec No (March): 75S - 84S.
  39. DiPietro, Janet A., Kathleen A. Costigan, and Edith D. Gurewitsch. 2005. "Maternal Psychophysiological Change during the Second Half of Gestation." *Biological Psychology* 69 (1): 23-38.
  40. Draghici, Adina E., and J. Andrew Taylor. 2016. "The Physiological Basis and Measurement of Heart Rate Variability in Humans." *Journal of Physiological Anthropology* 35 (1): 22.
  41. Ducas, Robin A., Jason E. Elliott, Steven F. Melnyk, Sheena Premecz, Megan daSilva, Kelby Cleverley, Piotr Wtorek, G. Scott Mackenzie, Michael E. Helewa, and Davinder S. Jassal. 2014. "Cardiovascular Magnetic Resonance in Pregnancy: Insights from the Cardiac Hemodynamic Imaging and Remodeling in Pregnancy (CHIRP) Study." *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 16 (1): 1.
  42. Dyavanapalli, Jhansi, Olga Dergacheva, Xin Wang, and David Mendelowitz. 2016. "Parasympathetic Vagal Control of Cardiac Function." *Current Hypertension Reports* 18 (3): 22.
  43. Elghozi, Jean-Luc, Dominique Laude, and Arlette Girard. 1991. "EFFECTS OF RESPIRATION ON BLOOD PRESSURE AND HEART RATE VARIABILITY IN HUMANS." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 18 (11): 735-42.
  44. Engelmann, M., K. Ebner, R. Landgraf, F. Holsboer, and C. T. Wotjak. 1999. "Emotional Stress Triggers Intrahypothalamic but Not Peripheral Release of Oxytocin in Male Rats." *Journal of Neuroendocrinology* 11 (11): 867-72.
  45. Fatima, Naureen, Sanket N. Patel, and Tahir Hussain. 2021. "Angiotensin II Type 2

- Receptor: A Target for Protection Against Hypertension, Metabolic Dysfunction, and Organ Remodeling." *Hypertension* 77 (6): 1845–56.
46. Gant, N. F., G. L. Daley, S. Chand, P. J. Whalley, and P. C. MacDonald. 1973. "A Study of Angiotensin II Pressor Response throughout Primigravid Pregnancy." *The Journal of Clinical Investigation* 52 (11): 2682–89.
  47. Garg, Priyanka, Kavita Yadav, Ashok Kumar Jaryal, Garima Kachhawa, Alka Kriplani, and Kishore Kumar Deepak. 2020. "Sequential Analysis of Heart Rate Variability, Blood Pressure Variability and Baroreflex Sensitivity in Healthy Pregnancy." *Clinical Autonomic Research: Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society* 30 (5): 433–39.
  48. Goldman, Jerome M., Ashley S. Murr, and Ralph L. Cooper. 2007. "The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies." *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 80 (2): 84–97.
  49. Goldman, Robert K., Afaf S. Azar, Julia M. Mulvaney, Carmen Hinojosa-Laborde, Joseph R. Haywood, and Virginia L. Brooks. 2009. "Baroreflex Sensitivity Varies during the Rat Estrous Cycle: Role of Gonadal Steroids." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296 (5): R1419–26.
  50. Gouzènes, L., M. G. Desarménien, N. Hussy, P. Richard, and F. C. Moos. 1998. "Vasopressin Regularizes the Phasic Firing Pattern of Rat Hypothalamic Magnocellular Vasopressin Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (5): 1879–85.
  51. Grindheim, Guro, Mette-Elise Estensen, Eldrid Langesaeter, Leiv Arne Rosseland, and Karin Toska. 2012. "Changes in Blood Pressure during Healthy Pregnancy: A Longitudinal Cohort Study." *Journal of Hypertension* 30 (2): 342–50.
  52. Grümmer, Ruth. 2006. "Animal Models in Endometriosis Research." *Human Reproduction Update* 12 (5): 641–49.
  53. Hardy, Donna Fitzroy. 1970. "Behavior of the Female Rat during Pregnancy, Pseudopregnancy, Lactation, and Following Ovariectomy." *Hormones and Behavior* 1 (3): 235–45.
  54. Hasser, E. M., and V. S. Bishop. 1990. "Reflex Effect of Vasopressin after Blockade of V1 Receptors in the Area Postrema." *Circulation Research* 67 (2): 265–71.
  55. Hasser, E. M., V. S. Bishop, and M. Hay. 1997. "Interactions between Vasopressin and Baroreflex Control of the Sympathetic Nervous System." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 24 (1): 102–8.
  56. Hayano, Junichiro, and Emi Yuda. 2021. "Assessment of Autonomic Function by Long-Term Heart Rate Variability: Beyond the Classical Framework of LF and HF Measurements." *Journal of Physiological Anthropology* 40 (1): 21.
  57. "Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology." 1996. *Circulation* 93 (5): 1043–65.
  58. Hernando, F., O. Schoots, S. J. Lolait, and J. P. Burbach. 2001. "Immunohistochemical Localization of the Vasopressin V1b Receptor in the Rat Brain and Pituitary Gland: Anatomical Support for Its Involvement in the Central Effects of Vasopressin." *Endocrinology* 142 (4): 1659–68.
  59. He, Xi, Ming Zhao, Xueyuan Bi, Lei Sun, Xiaojiang Yu, Mei Zhao, and Weijin Zang.

2015. "Novel Strategies and Underlying Protective Mechanisms of Modulation of Vagal Activity in Cardiovascular Diseases." *British Journal of Pharmacology* 172 (23): 5489–5500.
60. Hunter, S., and S. C. Robson. 1992. "Adaptation of the Maternal Heart in Pregnancy." *British Heart Journal* 68 (6): 540–43.
61. Hurbin, Amandine, Hélène Orcel, Gérard Alonso, Françoise Moos, and Alain Rabié. 2002. "The Vasopressin Receptors Colocalize with Vasopressin in the Magnocellular Neurons of the Rat Supraoptic Nucleus and Are Modulated by Water Balance." *Endocrinology* 143 (2): 456–66.
62. "Hypertension in Pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy." 2013. *Obstetrics and Gynecology* 122 (5): 1122–31.
63. Ivanisevic, M., O. Behrens, H. Helmer, K. Demarest, and A. R. Fuchs. 1989. "Vasopressin Receptors in Human Pregnant Myometrium and Decidua: Interactions with Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161 (6 Pt 1): 1637–43.
64. Japundzic, N., M. L. Grichois, P. Zitoun, D. Laude, and J. L. Elghozi. 1990. "Spectral Analysis of Blood Pressure and Heart Rate in Conscious Rats: Effects of Autonomic Blockers." *Journal of the Autonomic Nervous System* 30 (2): 91–100.
65. Japundzic-Zigon, N. 1998. "Physiological Mechanisms in Regulation of Blood Pressure Fast Frequency Variations." *Clinical and Experimental Hypertension* 20 (4): 359–88.
66. Japundžić-Žigon, Nina, Maja Lozić, Olivera Šarenac, and David Murphy. 2020. "Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review." *Current Neuropharmacology* 18 (1): 14–33.
67. Japundzic-Zigon, Nina, Sanja Milutinović, and Aleksandar Jovanović. 2004. "Effects of Nonpeptide and Selective V1 and V2 Antagonists on Blood Pressure Short-Term Variability in Spontaneously Hypertensive Rats." *Journal of Pharmacological Sciences* 95 (1): 47–55.
68. Jarvis, Sara S., Shigeki Shibata, Tiffany B. Bivens, Yoshiyuki Okada, Brian M. Casey, Benjamin D. Levine, and Qi Fu. 2012. "Sympathetic Activation during Early Pregnancy in Humans." *The Journal of Physiology* 590 (15): 3535–43.
69. Jawerbaum, Alicia, and Verónica White. 2010. "Animal Models in Diabetes and Pregnancy." *Endocrine Reviews* 31 (5): 680–701.
70. Johnston, C. I. 1985. "Vasopressin in Circulatory Control and Hypertension." *Journal of Hypertension* 3 (6): 557–69.
71. Jovanovic, Sladjana, Tamara Skoric, Olivera Sarenac, Sanja Milutinovic-Smiljanic, Nina Japundzic-Zigon, and Dragana Bajic. 2018. "Copula as a Dynamic Measure of Cardiovascular Signal Interactions." *Biomedical Signal Processing and Control* 43 (May): 250–64.
72. Julien, Claude, J. Philip Saul, and Gianfranco Parati. 2008. "Very Low Frequency Blood Pressure Fluctuations: Not Only Myogenic Responsiveness." *Journal of Hypertension*.
73. Karemaker, John M. 2009. "Counterpoint: Respiratory Sinus Arrhythmia Is due to the Baroreflex Mechanism." *Journal of Applied Physiology* 106 (5): 1742–43; discussion 1744.
74. Kawakami, Kohei, Hiroyuki Matsuo, Naoyo Kajitani, and Ken-Ichi Matsumoto. 2024. "Treatment of Spontaneously Hypertensive Rats during Pregnancy and Lactation with the Antioxidant Tempol Lowers Blood Pressure and Reduces Oxidative Stress."

- Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 73 (2): 136–44.
75. Ketch, Terry, Italo Biaggioni, Rosemarie Robertson, and David Robertson. 2002. "Four Faces of Baroreflex Failure: Hypertensive Crisis, Volatile Hypertension, Orthostatic Tachycardia, and Malignant Vagotonia." *Circulation* 105 (21): 2518–23.
76. Kim, Jeong Sook, Woong Bin Kim, Young-Beom Kim, Yeon Lee, Yoon Sik Kim, Feng-Yan Shen, Seung Won Lee, et al, 2011. "Chronic Hyperosmotic Stress Converts GABAergic Inhibition into Excitation in Vasopressin and Oxytocin Neurons in the Rat." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (37): 13312–22.
77. Klein, Hermann H., and Sibylle Pich. 2003. "[Cardiovascular changes during pregnancy]." *Herz* 28 (3): 173–74.
78. Kodogo, Vitaris, Ferial Azibani, and Karen Sliwa. 2019. "Role of Pregnancy Hormones and Hormonal Interaction on the Maternal Cardiovascular System: A Literature Review." *Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society* 108 (8): 831–46.
79. Koshimizu, Hisatsugu, Lorene M. Leiter, and Tsuyoshi Miyakawa. 2012. "M4 Muscarinic Receptor Knockout Mice Display Abnormal Social Behavior and Decreased Prepulse Inhibition." *Molecular Brain* 5 (April): 10.
80. Koshimizu, Taka-Aki, Kazuaki Nakamura, Nobuaki Egashira, Masami Hiroyama, Hiroshi Nonoguchi, and Akito Tanoue. 2012. "Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems." *Physiological Reviews* 92 (4): 1813–64.
81. Koshimizu, Taka-Aki, Yoshihisa Nasa, Akito Tanoue, Ryo Oikawa, Yuji Kawahara, Yasushi Kiyono, Tetsuya Adachi, et al, 2006. "V1a Vasopressin Receptors Maintain Normal Blood Pressure by Regulating Circulating Blood Volume and Baroreflex Sensitivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (20): 7807–12.
82. Kristiansson, P., and J. X. Wang. 2001. "Reproductive Hormones and Blood Pressure during Pregnancy." *Human Reproduction* 16 (1): 13–17.
83. Landry, Josette-Renée, Dixie L. Mager, and Brian T. Wilhelm. 2003. "Complex Controls: The Role of Alternative Promoters in Mammalian Genomes." *Trends in Genetics: TIG* 19 (11): 640–48.
84. Lang, R. E., D. Ganten, U. Ganten, W. Rascher, and T. Unger. 1984. "Pathogenesis of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats: Definite Evidence against a Pressor Role of Vasopressin." *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice* 6 (1-2): 121–38.
85. Laude, Dominique, Jean-Luc Elghozi, Arlette Girard, Elisabeth Bellard, Malika Bouhaddi, Paolo Castiglioni, Catherine Cerutti, et al, 2004. "Comparison of Various Techniques Used to Estimate Spontaneous Baroreflex Sensitivity (the EuroBaVar Study)." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286 (1): R226–31.
86. Laude, D., F. Weise, A. Girard, and J. L. Elghozi. 1995. "Spectral Analysis of Systolic Blood Pressure and Heart Rate Oscillations Related to Respiration." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 22 (5): 352–57.
87. LeFevre, Nicholas, and Ellisa Krumm. 2019. "Antihypertensive Drug Therapy for Mild to Moderate Hypertension During Pregnancy." *American Family Physician* 100 (7): 403–

- 5.
88. Leng, G., R. E. Blackburn, R. E. Dyball, and J. A. Russell. 1989. "Role of Anterior Periventricular Structures in the Regulation of Supraoptic Neuronal Activity and Neurohypophysial Hormone Secretion in the Rat." *Journal of Neuroendocrinology* 1 (1): 35-46.
  89. Leo, C. H., M. Jelinic, H. H. Ng, S. A. Marshall, J. Novak, M. Tare, K. P. Conrad, and L. J. Parry. 2017. "Vascular Actions of Relaxin: Nitric Oxide and beyond." *British Journal of Pharmacology* 174 (10): 1002-14.
  90. Lerman, Lilach O., Theodore W. Kurtz, Rhian M. Touyz, David H. Ellison, Alejandro R. Chade, Steven D. Crowley, David L. Mattson, et al, 2019. "Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association." *Hypertension* 73 (6): e87-120.
  91. Lindheimer, Marshall D., Sandra J. Taler, and F. Gary Cunningham. 2010. "Hypertension in Pregnancy." *Journal of the American Society of Hypertension: JASH* 4 (2): 68-78.
  92. Lopes-Azevedo, Silvana, Eduardo Albino Trindade Fortaleza, Cristiane Busnardo, América Augusto Scopinho, Melina Matthiesen, José Antunes-Rodrigues, and Fernando Morgan Aguiar Corrêa. 2020. "The Supraoptic Nucleus of the Hypothalamus Modulates Autonomic, Neuroendocrine, and Behavioral Responses to Acute Restraint Stress in Rats." *Neuroendocrinology* 110 (1-2): 10-22.
  93. Lozić, Maja, Tatjana Tasić, Andrew Martin, Michael Greenwood, Olivera Šarenac, Charles Hindmarch, Julian F. Paton, David Murphy, and Nina Japundžić-Žigon. 2016. "Over-Expression of V1A Receptors in PVN Modulates Autonomic Cardiovascular Control." *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 114 (December): 185-95.
  94. Ludwig, Mike, Nancy Sabatier, Philip M. Bull, Rainer Landgraf, Govindan Dayanithi, and Gareth Leng. 2002. "Intracellular Calcium Stores Regulate Activity-Dependent Neuropeptide Release from Dendrites." *Nature* 418 (6893): 85-89.
  95. Ludwig, Mike, and Javier Stern. 2015. "Multiple Signalling Modalities Mediated by Dendritic Exocytosis of Oxytocin and Vasopressin." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370 (1672).  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0182>.
  96. Mahendru, Amita A., Thomas R. Everett, Ian B. Wilkinson, Christoph C. Lees, and Carmel M. McEniery. 2014. "A Longitudinal Study of Maternal Cardiovascular Function from Preconception to the Postpartum Period." *Journal of Hypertension* 32 (4): 849-56.
  97. Malliani, Alberto. 2005. "Heart Rate Variability: From Bench to Bedside." *European Journal of Internal Medicine* 16 (1): 12-20.
  98. Malliani, A., M. Pagani, F. Lombardi, and S. Cerutti. 1991. "Cardiovascular Neural Regulation Explored in the Frequency Domain." *Circulation* 84 (2): 482-92.
  99. Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, and A. P. Tanno. 2002. "Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations." *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia* 62 (4A): 609-14.
  100. McKinley, M. J., A. M. Allen, C. N. May, R. M. McAllen, B. J. Oldfield, D. Sly, and F. A. Mendelsohn. 2001. "Neural Pathways from the Lamina Terminalis



- Influencing Cardiovascular and Body Fluid Homeostasis." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 28 (12): 990–92.
101. Mehlum, Maria H., Knut Liestøl, Sverre E. Kjeldsen, Stevo Julius, Tsushung A. Hua, Peter M. Rothwell, Giuseppe Mancia, Gianfranco Parati, Michael A. Weber, and Eivind Berge. 2018. "Blood Pressure Variability and Risk of Cardiovascular Events and Death in Patients with Hypertension and Different Baseline Risks." *European Heart Journal* 39 (24): 2243–51.
  102. Milutinović, Sanja, David Murphy, and Nina Japundzić-Zigon. 2006. "The Role of Central Vasopressin Receptors in the Modulation of Autonomic Cardiovascular Controls: A Spectral Analysis Study." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291 (6): R1579–91.
  103. Mishra, Jay S., Kathirvel Gopalakrishnan, and Sathish Kumar. 2018. "Pregnancy Upregulates Angiotensin Type 2 Receptor Expression and Increases Blood Flow in Uterine Arteries of Rats." *Biology of Reproduction* 99 (5): 1091–99.
  104. Mogos, Mulubrhan F., Mariann R. Piano, Barbara L. McFarlin, Jason L. Salemi, Kylea L. Liese, and Joan E. Briller. 2018. "Heart Failure in Pregnant Women: A Concern Across the Pregnancy Continuum." *Circulation. Heart Failure* 11 (1): e004005.
  105. Mohan, Shruti, Dawood Khan, R. Charlotte Moffett, Nigel Irwin, and Peter R. Flatt. 2018. "Oxytocin Is Present in Islets and Plays a Role in Beta-Cell Function and Survival." *Peptides* 100 (February): 260–68.
  106. Mohring, Jan, Jacqueline Kintz, Josiane Schoun, and J. Robert McNeill. 1981. "Pressor Responsiveness and Cardiovascular Reflex Activity in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats During Vasopressin Infusion." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 3 (5): 948.
  107. Molino, P., F. Veglio, G. C. Genova, R. Melchio, C. Benedetto, L. Chiarolini, F. Rabbia, T. Grosso, P. Mulatero, and L. Chiandussi. 1999. "Baroreflex Control of Heart Rate Is Impaired in Pre-Eclampsia." *Journal of Human Hypertension* 13 (3): 179–83.
  108. Morris, M., M. Keller, and D. K. Sundberg. 1983. "Changes in Paraventricular Vasopressin and Oxytocin during the Development of Spontaneous Hypertension." *Hypertension* 5 (4): 476–81.
  109. Natali, Troiano, Potje, Dias, and Antoniali. 2022. "Pregnancy Restores Altered Sympathetic Vasomotor Modulation and Parasympathetic Cardiac Modulation in Hypertensive Rats." *Pregnancy Hypertension* 28 (June): 180–88.
  110. Nicholson, H. D., R. W. Swann, G. D. Burford, D. C. Wathes, D. G. Porter, and B. T. Pickering. 1984. "Identification of Oxytocin and Vasopressin in the Testis and in Adrenal Tissue." *Regulatory Peptides* 8 (2): 141–46.
  111. Nisell, H., P. Hjemdahl, and B. Linde. 1985. "Cardiovascular Responses to Circulating Catecholamines in Normal Pregnancy and in Pregnancy-Induced Hypertension." *Clinical Physiology* 5 (5): 479–93.
  112. Nunn, Nicolas, Matthew Womack, Caroline Dart, and Richard Barrett-Jolley. 2011. "Function and Pharmacology of Spinally-Projecting Sympathetic Pre-Autonomic Neurones in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus." *Current Neuropharmacology* 9 (2): 262–77.
  113. Okamoto, K., and K. Aoki. 1963. "Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats." *Japanese Circulation Journal* 27 (March): 282–93.

114. Oliet, S. H., and C. W. Bourque. 1993. "Steady-State Osmotic Modulation of Cationic Conductance in Neurons of Rat Supraoptic Nucleus." *The American Journal of Physiology* 265 (6 Pt 2): R1475-79.
115. Ophir, A. G., G. Sorochman, B. L. Evans, and G. S. Prounis. 2013. "Stability and Dynamics of Forebrain Vasopressin Receptor and Oxytocin Receptor during Pregnancy in Prairie Voles." *Journal of Neuroendocrinology* 25 (8): 719-28.
116. Osol, George, Nga Ling Ko, and Maurizio Mandalà. 2019. "Plasticity of the Maternal Vasculature During Pregnancy." *Annual Review of Physiology* 81 (February): 89-111.
117. Palatini, Paolo, Gianpaolo Reboldi, Lawrence J. Beilin, Edoardo Casiglia, Kazuo Eguchi, Yutaka Imai, Kazuomi Kario, i sar, 2014. "Added Predictive Value of Night-Time Blood Pressure Variability for Cardiovascular Events and Mortality: The Ambulatory Blood Pressure-International Study." *Hypertension* 64 (3): 487-93.
118. Paller, M. S. 1984. "Mechanism of Decreased Pressor Responsiveness to ANG II, NE, and Vasopressin in Pregnant Rats." *The American Journal of Physiology* 247 (1 Pt 2): H100-108.
119. Panchal, S., A. M. Arria, and S. A. Labhsetwar. 2001. "Maternal Mortality during Hospital Admission for Delivery: A Retrospective Analysis Using a State-Maintained Database." *Anesthesia and Analgesia* 93 (1): 134-41.
120. Parati, Gianfranco, George S. Stergiou, Eamon Dolan, and Grzegorz Bilo. 2018. "Blood Pressure Variability: Clinical Relevance and Application." *Journal of Clinical Hypertension* 20 (7): 1133-37.
121. Parati, G., J. P. Saul, M. Di Rienzo, and G. Mancia. 1995. "Spectral Analysis of Blood Pressure and Heart Rate Variability in Evaluating Cardiovascular Regulation. A Critical Appraisal." *Hypertension* 25 (6): 1276-86.
122. Parry, L. J., R. S. Poterski, and A. J. Summerlee. 1994. "Effects of Relaxin on Blood Pressure and the Release of Vasopressin and Oxytocin in Anesthetized Rats during Pregnancy and Lactation." *Biology of Reproduction* 50 (3): 622-28.
123. Paton, J. F. R., P. Boscan, A. E. Pickering, and E. Nalivaiko. 2005. "The Yin and Yang of Cardiac Autonomic Control: Vago-Sympathetic Interactions Revisited." *Brain Research. Brain Research Reviews* 49 (3): 555-65.
124. Paxinos, George, and Charles Watson. 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Elsevier.
125. Pinto, Y. M., M. Paul, and D. Ganten. 1998. "Lessons from Rat Models of Hypertension: From Goldblatt to Genetic Engineering." *Cardiovascular Research* 39 (1): 77-88.
126. Porzionato, Andrea, Veronica Macchi, Carla Stecco, and Raffaele De Caro. 2019. "The Carotid Sinus Nerve-Structure, Function, and Clinical Implications." *Anatomical Record* 302 (4): 575-87.
127. Pumprla, Jiri, Kinga Howorka, David Groves, Michael Chester, and James Nolan. 2002. "Functional Assessment of Heart Rate Variability: Physiological Basis and Practical Applications." *International Journal of Cardiology* 84 (1): 1-14.
128. Purkayastha, Sushmita, Kaitlyn Maffuid, Xiaojie Zhu, Rong Zhang, and Peter B. Raven. 2018. "The Influence of the Carotid Baroreflex on Dynamic Regulation of Cerebral Blood Flow and Cerebral Tissue Oxygenation in Humans at Rest and during Exercise." *European Journal of Applied Physiology* 118 (5): 959-69.

129. Rascher, W., E. Weidmann, and F. Gross. 1981. "Vasopressin in the Plasma of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats." *Clinical Science* 61 (3): 295–98.
130. Reckelhoff, Jane F., Damian G. Romero, and Licy L. Yanes Cardozo. 2019. "Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models." *Physiology* 34 (3): 178–88.
131. Reyes, Laura M., Charlotte W. Usselman, Margie H. Davenport, and Craig D. Steinback. 2018. "Sympathetic Nervous System Regulation in Human Normotensive and Hypertensive Pregnancies." *Hypertension* 71 (5): 793–803.
132. Ribeiro, Natalia, Helena do Nascimento Panizza, Karoline Martins Dos Santos, Hildebrando C. Ferreira-Neto, and Vagner Roberto Antunes. 2015. "Salt-Induced Sympathoexcitation Involves Vasopressin V1a Receptor Activation in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 309 (11): R1369–79.
133. Sanghavi, Monika, and John D. Rutherford. 2014. "Cardiovascular Physiology of Pregnancy." *Circulation* 130 (12): 1003–8.
134. Savić, Bojana, Andrew Martin, Andre Souza Mecawi, Zoran Bukumirić, José Antunes-Rodrigues, David Murphy, Olivera Šarenac, and Nina Japundžić-Žigon. 2020. "Vasopressin and v1br Gene Expression Is Increased in the Hypothalamic Pvn of Borderline Hypertensive Rats." *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 43 (11): 1165–74.
135. Savić, Bojana, David Murphy, and Nina Japundžić-Žigon. 2022. "The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in Control of Blood Pressure and Blood Pressure Variability." *Frontiers in Physiology* 13 (March): 858941.
136. Seely, Ellen W., and Jeffrey Ecker. 2014. "Chronic Hypertension in Pregnancy." *Circulation* 129 (11): 1254–61.
137. Sessa, Francesco, Valenzano Anna, Giovanni Messina, Giuseppe Cibelli, Vincenzo Monda, Gabriella Marsala, Maria Ruberto, i sar, 2018. "Heart Rate Variability as Predictive Factor for Sudden Cardiac Death." *Aging* 10 (2): 166–77.
138. Shaffer, Fred, and J. P. Ginsberg. 2017. "An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms." *Frontiers in Public Health* 5 (September): 258.
139. Sheikh, Abu Baker, Paul A. Sobotka, Ishan Garg, Jessilyn P. Dunn, Abdul Mannan Khan Minhas, Md Mobashir Hasan Shandhi, Jeroen Molinger, Barry J. McDonnell, and Marat Fudim. 2023. "Blood Pressure Variability in Clinical Practice: Past, Present and the Future." *Journal of the American Heart Association*, [May. https://doi.org/10.1161/JAHA.122.029297](https://doi.org/10.1161/JAHA.122.029297).
140. Slangen, B. F., I. C. Out, B. J. Janssen, and L. L. Peeters. 1997. "Blood Pressure and Heart Rate Variability in Early Pregnancy in Rats." *The American Journal of Physiology* 273 (4): H1794–99.
141. Sliwa, Karen, and Michael Böhm. 2014. "Incidence and Prevalence of Pregnancy-Related Heart Disease." *Cardiovascular Research* 101 (4): 554–60.
142. Soma-Pillay, Priya, Catherine Nelson-Piercy, Heli Tolppanen, and Alexandre Mebazaa. 2016. "Physiological Changes in Pregnancy." *Cardiovascular Journal of Africa* 27 (2): 89–94.
143. Son, Sook Jin, Jessica A. Filosa, Evgeniy S. Potapenko, Vinicia C. Biancardi, Hong Zheng, Kaushik P. Patel, Vicky A. Tobin, Mike Ludwig, and Javier E. Stern. 2013.

- “Dendritic Peptide Release Mediates Interpopulation Crosstalk between Neurosecretory and Preautonomic Networks.” *Neuron* 78 (6): 1036–49.
144. Stauss, Harald M., Julia A. Moffitt, Mark W. Chapleau, Francois M. Abboud, and Alan Kim Johnson. 2006. “Baroreceptor Reflex Sensitivity Estimated by the Sequence Technique Is Reliable in Rats.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*.
  145. Stauss, Harald M., and Pontus B. Persson. 2000. “Role of Nitric Oxide in Buffering Short-Term Blood Pressure Fluctuations.” *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 15 (October): 229–33.
  146. Steinback, Craig D., Graham M. Fraser, Charlotte W. Usselman, Laura M. Reyes, Colleen G. Julian, Michael K. Stickland, Radha S. Chari, Rshmi Khurana, Sandra T. Davidge, and Margie H. Davenport. 2019. “Blunted Sympathetic Neurovascular Transduction during Normotensive Pregnancy.” *The Journal of Physiology* 597 (14): 3687–96.
  147. Szczepanska-Sadowska, E., A. Cudnoch-Jedrzejewska, and A. Wsol. 2020. “The Role of Oxytocin and Vasopressin in the Pathophysiology of Heart Failure in Pregnancy and in Fetal and Neonatal Life.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 318 (3): H639–51.
  148. Szczepanska-Sadowska, E., K. Stepniakowski, M. M. Skelton, and A. W. Cowley Jr. 1994. “Prolonged Stimulation of Intrarenal V1 Vasopressin Receptors Results in Sustained Hypertension.” *The American Journal of Physiology* 267 (5 Pt 2): R1217–25.
  149. Szczepanska-Sadowska, Ewa, Tymoteusz Zera, Piotr Sosnowski, Agnieszka Cudnoch-Jedrzejewska, Anna Puszko, and Aleksandra Misicka. 2017. “Vasopressin and Related Peptides; Potential Value in Diagnosis, Prognosis and Treatment of Clinical Disorders.” *Current Drug Metabolism* 18 (4): 306–45.
  150. Takezawa, H., H. Hayashi, H. Sano, and S. Ebihara. 1994. “Estrous-Related Variations of Blood Pressure and Heart Rate in Female Rats.” *Frontiers of Medical and Biological Engineering: The International Journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering* 6 (2): 131–37.
  151. Takezawa, H., H. Hayashi, H. Sano, H. Saito, and S. Ebihara. 1994. “Circadian and Estrous Cycle-Dependent Variations in Blood Pressure and Heart Rate in Female Rats.” *The American Journal of Physiology* 267 (5 Pt 2): R1250–56.
  152. Tarantal, Alice F., Dennis J. Hartigan-O’Connor, and Stephen C. Noctor. 2022. “Translational Utility of the Nonhuman Primate Model.” *Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 7 (5): 491–97.
  153. Tasić, Tatjana, Drago M. Djordjević, Silvio R. De Luka, Alexander M. Trbovich, and Nina Japundžić-Žigon. 2017. “Static Magnetic Field Reduces Blood Pressure Short-Term Variability and Enhances Baro-Receptor Reflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats.” *International Journal of Radiation Biology* 93 (5): 527–34.
  154. Teli, Anita, Shrilaxmi Bagali, and Ravi Ghatanatti. 2016. “A Prediction Formula for Double Product in Pregnancy.” *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 10 (2): CC20–22.
  155. Teufel, Felix, Pascal Geldsetzer, Nikkil Sudharsanan, Malavika Subramanyam, H. Manisha Yapa, Jan-Walter De Neve, Sebastian Vollmer, and Till Bärnighausen. 2021.

- "The Effect of Bearing and Rearing a Child on Blood Pressure: A Nationally Representative Instrumental Variable Analysis of 444 611 Mothers in India." *International Journal of Epidemiology* 50 (5): 1671–83.
156. Tkachenko, Oleksandra, Dmitry Shchekochikhin, and Robert W. Schrier. 2014. "Hormones and Hemodynamics in Pregnancy." *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 12 (2): e14098.
  157. Triedman, J. K., and J. P. Saul. 1994. "Blood Pressure Modulation by Central Venous Pressure and Respiration. Buffering Effects of the Heart Rate Reflexes." *Circulation* 89 (1): 169–79.
  158. Troiano, Jéssica A., Simone R. Potje, Murilo E. Graton, Daniela S. Silva, Rafael M. da Costa, Rita C. Tostes, and Cristina Antoniali. 2021. "Pregnancy Decreases O-GlcNAc-Modified Proteins in Systemic Arteries of Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats." *Life Sciences* 266 (February): 118885.
  159. Turukalo, Tatjana Loncar, Dragana Bajic, and Nina Japundzic Zigon. 2011. "Temporal Sequence Parameters in Isodistributional Surrogate Data: Model and Exact Expressions." *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 58 (1): 16–24.
  160. Umazume, Takeshi, Takahiro Yamada, Satoshi Yamada, Satoshi Ishikawa, Itsuko Furuta, Hiroyuki Iwano, Daisuke Murai, i sar, 2018. "Morphofunctional Cardiac Changes in Pregnant Women: Associations with Biomarkers." *Open Heart* 5 (2): e000850.
  161. Vaccari, C., S. J. Lolait, and N. L. Ostrowski. 1998. "Comparative Distribution of Vasopressin V1b and Oxytocin Receptor Messenger Ribonucleic Acids in Brain." *Endocrinology* 139 (12): 5015–33.
  162. Van Tol, H. H., E. L. Bolwerk, B. Liu, and J. P. Burbach. 1988. "Oxytocin and Vasopressin Gene Expression in the Hypothalamo-Neurohypophyseal System of the Rat during the Estrous Cycle, Pregnancy, and Lactation." *Endocrinology* 122 (3): 945–51.
  163. Vaschillo, Evgeny, Paul Lehrer, Naphtali Rishe, and Mikhail Konstantinov. 2002. "Heart Rate Variability Biofeedback as a Method for Assessing Baroreflex Function: A Preliminary Study of Resonance in the Cardiovascular System." *Applied Psychophysiology and Biofeedback* 27 (1): 1–27.
  164. Visontai, Z., Z. Lenard, P. Studinger, J. Rigo Jr, and M. Kollai. 2002. "Impaired Baroreflex Function during Pregnancy Is Associated with Stiffening of the Carotid Artery." *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 20 (4): 364–69.
  165. Voss, A., H. Malberg, A. Schumann, N. Wessel, T. Walther, H. Stepan, and R. Faber. 2000. "Baroreflex Sensitivity, Heart Rate, and Blood Pressure Variability in Normal Pregnancy." *American Journal of Hypertension* 13 (11): 1218–25.
  166. Walters, Kirsty A., Charles M. Allan, and David J. Handelsman. 2012. "Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome." *Biology of Reproduction* 86 (5): 149, 1–12.
  167. Wang, Wei, Xin Xie, Ting Yuan, Yanyan Wang, Fei Zhao, Zhangjian Zhou, and Hao Zhang. 2021. "Epidemiological Trends of Maternal Hypertensive Disorders of Pregnancy at the Global, Regional, and National Levels: A Population-based Study." *BMC Pregnancy and Childbirth* 21 (1): 364.
  168. Wei, Hao-Hua, Xiang-Shan Yuan, Ze-Ka Chen, Pei-Pei Chen, Zhe Xiang, Wei-Min Qu,

- Rui-Xi Li, Guo-Min Zhou, and Zhi-Li Huang. 2021. "Presynaptic Inputs to Vasopressin Neurons in the Hypothalamic Supraoptic Nucleus and Paraventricular Nucleus in Mice." *Experimental Neurology* 343 (September): 113784.
169. Zancheta, Dalise, Jéssica A. Troiano, Simone R. Potje, Priscila Cavalari, Doris H. Sumida, and Cristina Antoniali. 2015. "The PI3K-Akt-eNOS Pathway Is Involved in Aortic Hyporeactivity to Phenylephrine Associated with Late Pregnancy in Spontaneously Hypertensive Rats." *Life Sciences* 122 (February): 78–86.
170. Zemo, D. A., and J. T. McCabe. 2001. "Salt-Loading Increases Vasopressin and Vasopressin 1b Receptor mRNA in the Hypothalamus and Choroid Plexus." *Neuropeptides* 35 (3-4): 181–88.
171. Hasser EM, Bishop VS, Hay M. Interactions between vasopressin and baroreflex control of the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997;24(1):102-8.
172. Suarez-Roca H, Mamoun N, Sigurdson MI, Maixner W. Baroreceptor Modulation of the Cardiovascular System, Pain, Consciousness, and Cognition. *Compr Physiol*. 2021; 11(2):1373-1423.
173. Hayano, J., Yuda, E. Assessment of autonomic function by long-term heart rate variability: beyond the classical framework of LF and HF measurements. *J Physiol Anthropol* 40, 21 (2021).
174. Martinez-Alanis, Marisol, Martín Calderón-Juárez, Paola Martínez-García, Gertrudis Hortensia González Gómez, Oscar Infante, Héctor Pérez-Grovas, and Claudia Lerma. 2023. "Baroreflex Sensitivity Assessment Using the Sequence Method with Delayed Signals in End-Stage Renal Disease Patients" *Sensors* 23, no. 1: 260.
175. Teli A, Bagali S, Ghatanatti R. A Prediction Formula for Double Product in Pregnancy. *J Clin Diagn Res*. 2016 Feb;10(2):CC20-2.
176. Teufel F, Geldsetzer P, Sudharsanan N, Subramanyam M, Yapa HM, De Neve JW, Vollmer S, Bärnighausen T. The effect of bearing and rearing a child on blood pressure: a nationally representative instrumental variable analysis of 444 611 mothers in India. *Int J Epidemiol*. 2021 Nov 10;50(5):1671-1683.
177. Wang Y, Tang HR, Wang Y, Zheng MM, Ye XD, Dai YM, Hu YL. [Association between gestational blood pressure and pregnancy induced hypertension or pre-eclampsia]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2021 Nov 25;56(11):767-773.
178. Subramanian, Senthil Kumar, Vivek Kumar Sharma, Vinayathan Arunachalam, Rajathi Rajendran, and Archana Gaur. 2019. "Comparison of Baroreflex Sensitivity and Cardiac Autonomic Function Between Adolescent Athlete and Non-Athlete Boys - A Cross-Sectional Study." *Frontiers in Physiology* 10 (August): 1043.

**Publikovani radovi iz teze:**

1. Jovanović M, Stevanović B, Pajović V, Tasić T, Lozić M, Đukić Lj, Kosić M, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Vasopressin and cardiovascular autonomic adjustment in chronic hypertensive pregnancy. *Hypertension Research*. DOI: 10.1038/s41440-024-01769 (M21, IF 5,4)

## BIOGRAFIJA

Mirjana Jovanović je rođena u Beogradu 1984. gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2003, a diplomirala 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.17/10. Školske 2011/2012 upisala je DAS, izborni modul Fiziološke nauke i kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja je raspoređena na projekat III Funkcionalna genomika hipotalamusa i medule oblongate u hroničnoj hipertenziji. 1.11.2012. zasniva radni odnos kao istraživač pripravnik, a 1.11.2015. godine kao saradnik u nastavi na Institutu za patološku fiziologiju "Ljubodrag Buba Mihailović". U zvanju asistenta je od 1.11.2017. U svom radu usredsređena je na problematiku hronične hipertenzije u trudnoći, odnosno istraživanje centralnih i perifernih regulacionih mehanizama adaptacije na trudnoću. Obučena je za rad sa eksperimentalnim životinjama, tehnike kanulacije krvnih sudova i telemetrije, obradu signala u DSI i BP complete programima, kao i analizu podataka u SPSS.u. Takođe ovladala je i metodom RT-PCR.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Мирјана Јовановић

Број индекса ФН-01/11

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

НЕУРОКАРДИОГЕНА АДАПТАЦИЈА НА ТРУДНОЋУ У ХРОНИЧНОЈ  
ХИПЕРТЕНЗИЈИ

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

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

Мирјана Јовановић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Јовановић

Број индекса ФН-01/11

Студијски програм ФИЗИОЛОШКЕ НАУКЕ

Наслов рада НЕУРОКАРДИОГЕНА АДАПТАЦИЈА НА ТРУДНОЋУ У ХРОНИЧНОЈ ХИПЕРТЕНЗИЈИ

Ментор Проф. др Нина Жигон

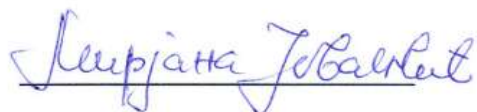
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_



## Изјава о коришћењу

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

НЕУРОКАРДИОГЕНА АДАПТАЦИЈА НА ТРУДНОЋУ У ХРОНИЧНОЈ ХИПЕРТЕНЗИЈИ

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

