

UTICAJ SEZONE NA KONCENTRACIJU PROTEINA TOPLOTNOG ŠOKA Hsp70 U KRVI KRAVA

EFFECT OF SEASON ON HEAT SHOCK PROTEINS Hsp70 CONCENTRATION IN COWS BLOOD

Miloš Ž. Petrović^{*}, Radojica Đoković^a, Zoran Ž. Ilić^b, Simeon Rakonjac^a, Snežana Bogosavljević Bošković^a, Vladimir Kurčubić^a, Milun D. Petrović^a

^aUniverzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija;

^bUniverzitet u Prištini, Poljoprivredni fakultet, Kopaonička bb, Lešak, Srbija;

Autor za kontakt: petrovic.milos87@kg.ac.rs; tel +381642883550

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Agriculture in Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia;

^bUniversity of Priština, Faculty of Agriculture, Kopaonička bb, Lešak, Serbia;

Corresponding author: petrovic.milos87@kg.ac.rs; phone +381642883550

SAŽETAK

Cilj ovog rada je da se utvrdi koncentracija Hsp70 u krvnom serumu krava i ispita njegova povezanost sa vrednostima indeksa toplotnog stresa kod krava (THI) u momentu uzimanja krvi. U ogleđ je uključeno 7 krava Holštajn frizijske rase, u drugoj i trećoj laktaciji. Krave su držane u slobodnom sistemu i hranjene standardnim obrokom i umiksanom smešom. Voda je bila dostupna ad libitum. Krave su bile normalne telesne kondicije u skladu sa periodom laktacije u kom su se nalazile. Od svake krave krv je uzimana tokom prve ili druge nedelje marta, maja i jula. Krv je uzimana uvek u isto vreme, ali u različitim uzastopnim danima, kako bi se utvrdila veza sa THI indeksom. Kod ispitivanih krava koncentracija Hsp70 imala je sledeće vrednosti: 4,75±1,1 ng/mL u martu; 6,05±1,4 ng/mL u maju i 8,9±2,3 ng/mL u julu. Indeks opterećenosti krava toplotnim stresom (THI) u okviru ispitivane sezone kretao se od 55,6 u martu, 66,9 u maju do 75,6 u julu mesecu. Koncentracija Hsp70 i THI indeks bili su značajno viši kako se ide od proleća ka letu. Rezultati ispitivanja pokazuju porast koncentracije Hsp70 sa porastom THI indeksa. Nađena je pozitivna korelacija između serumske Hsp70 i vrednosti THI indeksa.

Ključne reči: sezona, toplotni stres, Hsp70, mlečne krave.

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the concentration of Hsp70 in the blood serum of cows and to examine its relationship with the values of the heat stress index in cows (THI) at the time of blood collection. Experiment included 7 cows of Holstein Friesian breed, in the second and third lactation. Cows were kept in a free system and fed with a standard meal and mixed mixture. Water was available ad libitum. The cows were of normal body condition according to the lactation period. Blood was taken from each cow during the first or second week of March, May and July. Blood was taken at the same time, but on different consecutive days, to establish a relationship with the THI index. In the cows tested, the concentration of

Hsp70 had the following values: 4.75 ± 1.1 ng / mL in March; 6.05 ± 1.4 ng / mL in May and 8.9 ± 2.3 ng / mL in July. The cow heat stress index (THI) during the study season ranged from 55.6 in March, 66.9 in May to 75.6 in July. The Hsp70 concentration and THI index were significantly higher from spring to summer. The test results show an increase in Hsp70 concentration with an increase in the THI index. A positive correlation was found between serum Hsp70 and THI values.

Key words: season, heat stress, Hsp70, dairy cows.

UVOD

Proteini toplotnog šoka (Heat shock proteins, Hsp) su čaperoni neophodni za pravilno formiranje polipeptidnog lanca i odgovorni su za njegovu translokaciju u ćeliji. Ovi proteini su pronađeni tokom izlaganja toplotnom stresu, kada je njihova koncentracija i ekspresija u ćelijama rasla, čime se objašnjava njihov naziv (1). Proteini toplotnog šoka Hsp su filogenetski konzervirani i ubikvitarni molekuli koji se sintetišu u odgovoru na različite oblike stresa. Naime, sve ćelije, tkiva ili organizmi reaguju na različite vrste stresa (oksidativni stres, termički stres, ishemija, vežbanje, metabolički stres) brзом ekspresijom specifične grupe proteina, proteina toplotnog šoka (Hsp). Najpoznatiji članovi familije Hsp70 su: stresom indukovani oblik HSP70 / HSP72 (HSPA1A). Kod goveda je identifikovano četiri vrste gena za Hsp70, a iRNK za ovaj protein nađena je u tkivu različitih vrsta ćelija i u krvnoj plazmi (2,3). Najviše proučavani Hsp su Hsp73 i Hsp72. Hsp73 se sintetizuje u većini ćelija organizama i malo je inducibilan. Citosolni inducibilni oblik Hsp72 (72 kDa), može predstavljati i do 20% ukupnog ćelijskog proteina i može posredovati kroz citoprotektivne, antiapoptotske i imunološke regulatorne efekte (2).

Hsp70 u zavisnosti od lokalizacije ima sposobnost da ispolji potpuno suprotne efekte. Ekstracelularni (eHsp70) dospeva iz ćelija u krvotok iz živih ćelija izloženih stresu putem vezikularne sekrecije, egzozoma ili lizozoma i preko intaktne lipidne membrane, ali i pasivnim putem iz oštećenih i nekrotičnih ćelija (4). Intracelularni (iHsp70) pomaže u ponovnom

uspostavljanju prirodne konformacije denaturiranih proteina pod uticajem različitih stresora, sprečavajući njihovu agregaciju i čuvajući ćelije od apoptoze i ispoljavajući antiinflamatorno dejstvo. Ekstracelularni Hsp70 ima ulogu citokina, imunostimulirajuću ulogu (pomaže u sintezi proinflamatornih citokina) i poboljšava antitumorsku kontrolu (5).

U radu Petrovića i sar. (4) kao odgovor na metabolički stres tokom tranzicionog perioda, kod muznih krava se razvijaju brojni patofiziološki mehanizmi (inflamacija, insulinska rezistencija i metabolička adaptacija). Proteini toplotnog udara imaju značajan uticaj u regulaciju ovih procesa kod različitih životinjskih vrsta i kod ljudi. Pomažu u očuvanju proteinske strukture ćelije i njenom preživljavanju. Međutim, ako se nađu ekstracelularno, pokazuju proinflamatorne efekte i imaju veze sa razvojem insulinske rezistencije i dijabetesa.

U organizmu muznih krava aktiviraju se brojni mehanizmi, čija je glavna uloga da sve te procese održava u fiziološkim granicama. U regulaciji ovih dominantnih procesa kod mlečnih krava, HSP 70 proteini toplotnog stresa igraju ključnu ulogu (6).

Periodi toplotnog stresa koji su uzrokovani mnogobrojnim faktorima životne sredine smanjuju produktivnost životinja sa velikim ekonomskim posledicama na svetskom nivou. Visoke temperature kako dnevne tako i na mesečnom nivou i visoka vlažnost vazduha štetno deluju na produktivnost muznih krava.

Krave u laktaciji imaju povećanu osetljivost na toplotni stres u poređenju sa zasušenim kravama, usled povećanja metabolizma za proizvodnju mleka (7).

Mnogi autori ističu da sposobnost preživara da regulišu telesnu temperaturu zavisi i od vrste i rase. Mlečne rase goveda su osetljivije na toplotni stres od tovnih rasa, a životinje sa visokom proizvodnjom podložnije su toplotnom stresu jer proizvode više metaboličke toplote. Dokazi upućuju da unutar domestifikovanih preživara postoje razlike između vrste, rase i nivoa proizvodnje u pogledu osetljivosti na toplotni stres (8-10). Štaviše, zbog pozitivnog odnosa proizvodnje mleka i proizvodnje toplote, krave sa većom proizvodnjom su izložene toplotnom stresu nego životinje sa nižom proizvodnjom mleka (11). Muzne krave poput drugih homeotermičkih životinja izložene visokim ambijentalnim temperaturama, povećavaju puteve gubitka toplote i smanjuju njenu proizvodnju u pokušaju da održe euthermitu.

U korpori mamilariji zadnjeg hipotalamusa dolaze signali iz preoptičke regije i sa periferije tela, pa oni zajedno podstiču reakcije za stvaranje toplote ili za odavanje toplote. Ovaj sistem se zove hipotalamusni termostat (12). Jedan od najvažnijih činilaca komfora i dobrobiti životinja je stalna ambijentalna temperatura (13). Cincović (14) ističe da toplotni stres predstavlja stanje u kojem su životinje izložene visokim temperaturama okoline koje su izvan biološkog optimuma. Zbog direktnog uticaja tih uslova, proizvodnja toplote kod životinje je veća od njenog oslobađanja. U ovom se slučaju energija koristi za hlađenje da bi se homeotermija zadržala umesto da se koristi za produktivnost životinja.

Neposredni fiziološki odgovori na toplotno opterećenje kod muznih krava su povećan broj respiracija, smanjen unos hrane i povećan unos vode. Takođe, toplotni stres utiče i na zahteve za održavanje dinamičke ravnoteže organizma i metaboličke procese, efikasnost iskorišćavanja hrane, prinos mleka po grlu i grupi, reproduktivnu efikasnost krava (duži servis period), izmenjeno ponašanje muznih krava i učestalost pojave bolesti u peripartalnom periodu i periodu laktacije.

Kod krava izloženih toplotnom stresu, trenutni mehanizam suzbijanja stresa je smanjenje unosa hrane, što uzrokuje smanjenje dostupnosti hranljivih sastojaka koji se koriste za sintezu mleka (15-17). Smanjena produktivnost posledica je i metaboličkih i endokrinih adaptacija. Smanjeni unos hrane uzrokuje i smanjenje koncentracije glukoze u peripartalnom i laktacionom periodu (18). Krave za vreme toplotnog stresa imaju smanjen unos hrane, ali su smanjena i lipoliza i ketogeneza. Pored toga, hormoni koji regulišu homeostazu u laktaciji u toplotnom stresu gube tu sposobnost (19, 20). Kao posledica toplotnog stresa, metaboličke promene neposredno utiču na proizvodnju mleka. Dinamičke promene vrednosti metabolita mogu pokazati prilagođavanje životinja na stres (21).

Klima Evrope se znatno izmenila, što ukazuje na ukupni porast temperature od 1°C (na godišnjem nivou), porast padavina u severnoj Evropi, kao i veći broj vrućih, i sunčanih dana u jugoistočnoj Evropi, praćenih povremenim toplotnim talasima (22). Vranić i Milutinović (23) izjavili su da će Srbija verovatno doživeti porast temperature do 4°C i pad letnjih padavina do 50%.

Glavni pokazatelj toplotnog naprezanja je indeks temperaturne vlažnosti (THI), koji predstavlja vezu između temperature vazduha i relativne vlažnosti. Toplotni stres kod muznih krava se javlja kada THI prelazi 72 (9,24). U našem geografskom području na teritoriji Republike Srbije to se događa od druge polovine maja do kraja septembra. Retrospektivne analize su pokazale da je kritična vrednost THI indeksa iznad koje se javljaju fiziološke adaptacije, pad produktivnosti i patofiziološke izmene na nivou od 72 (15,25). Ovu vrednost kao kritičnu je pokazao i veliki broj istraživača u svetu.

Termoneutralna zona se nalazi između donje i gornje kritične ambijentalne temperature. Smatra se da donja kritična temperatura kod mlečnih krava koje proizvode 30 kg mleka dnevno iznosi od -16 °C do -37 °C. Gornja kritična temperatura

iznad koje se može razviti hipertermija iznosi 25-26 °C (9). Prema Polsky i von Keyserlingk (26), broj dana u kojima indeks temperaturne vlažnosti (THI) prelazi prag komfora (> 72) raste na severu Sjedinjenih Država, Kanade i Evrope.

Na severu Republike Srbije u AP Vojvodina, maksimalne dnevne vrednosti THI pokazale su pozitivan trend od 2005. do 2016. za sve mesece izuzev za januar, oktobar i novembar (27). Cincović i sar. (27) su pokazali negativnu korelaciju između prosečne desetogodišnje THI vrednosti i proizvodnje mleka i pozitivnu korelaciju sa temperaturom kože vimena.

Takođe, toplotni stres kod muznih krava karakteriše smanjen prinos i izmenjeni sastav mleka (28). Pad produktivnosti nastaje zbog smanjenog unosa hrane, kao rezultat endokrine i metaboličke adaptacije na visoku telesnu temperaturu i okolinu (29, 30). Faza laktacije je važan faktor koji loše utiče na proizvodnju mleka tokom toplotnog stresa. Utvrđeno je da su muzne krave na sredini laktacije osetljivije u odnosu na muzne krave u ranoj i kasnoj laktaciji (31). Međutim, prema Cincović i sar. (32) toplotni stres ne utiče na prinos mleka, mlečne masti i procenat proteina na nivou cele laktacije, bez obzira na period laktacije u kom su krave bile izložene stresu. Vrednost THI bila je između 72 i 82, što ukazuje na postojanje umerenog intenziteta toplotnog stresa.

Uprkos napretku u sistemima za hlađenje i menadžmentu životne sredine, toplotni stres i dalje predstavlja veliki trošak za globalnu stočarsku proizvodnju (33). Mlečne krave su izuzetno osetljive na visoke temperature (34), a toplotni stres ne samo da smanjuje prinos mleka za 35% - 40% (15), već dovodi i do zdravstvenih problema i metaboličkih poremećaja (34, 35). Berman (36) je nagovestio da efektivna temperatura okoline iznad 35 °C aktivira reakciju toplotnog stresa kod mlečnih krava. Reakcija na toplotni stres uključuje aktiviranje transkripcionog faktora toplotnog stresa (HSF) i pojačanu ekspresiju proteina toplotnog šoka (Hsp) (37). U radu Kavanagh i sar., (38) i Gaughan i sar., (39) pokazano je da se koncentracija

ekstraćelijskog Hsp70 povećava i tokom izlaganja životinja toplotnom stresu. U mnogim radovima pokazano je da je familija faktora transkripcije (HSF), važan prvi odgovor tokom toplotnog stresa (40, 41). Proteini toplotnog šoka (Hsp) se smatraju potencijalnim pokazateljima prilagođavanja životinja teškim uslovima stresa iz okoline i koreliraju sa otpornošću na stres (42). Tradicionalno, indeks temperaturne vlažnosti (THI) koristi se kao indeks za procenu stepena toplotnog stresa kod mlečnih krava (34). Prednost THI-a je u tome što se lako koristiti u praksi, ali THI je samo gruba procena toplotnog stresa, a ne direktna reakcija samog metabolizma životinje. Na centralnu ulogu koju Hsp ima u citoprotekciji tokom toplotnog stresa, pokazuje činjenica da prekomerna ekspresija Hsp štiti od hipertermije i cerebralne ishemije tokom toplotnog udara (43). Toplotni šok uzrokuje pojačanu sintezu Hsp, smanjenu sintezu proteina, mitohondrijsko oticanje i kretanje organela dalje od plazma membrane povezane sa reorganizacijom citoskeleta (44- 46). Maloyan i Horovitz (47) izvestili su da je prekomerna ekspresija Hsp72 zajedno sa hormonalnim signalima sastavni deo procesa aklimatizacije na povišenu temperaturu.

Poznato je veoma malo informacija koje pokazuju da HSF u serumu i Hsp mogu biti biomarkeri za vreme toplotnog stresa. Stoga, cilj ovog rada je da se utvrdi koncentracija Hsp70 u krvnom serumu krava i ispita njegova povezanost sa vrednostima indeksa toplotnog stresa kod krava (THI) u momentu uzimanja krvi.

MATERIJAL I METODE

Materijal – U ogled je uključeno 7 krava Holštajn frizijske rase. Krave su hranjene standardnim obrokom i umiksanom smešom. Bile su u drugoj i trećoj laktaciji. Držane su u slobodnom sistemu. Voda je bila dostupna ad libitum. Krave su bile normalne telesne kondicije u skladu sa periodom laktacije u kom su se nalazile.

Uzimanje krvi i određivanje Hsp70 – Od svake krave krv je uzimana tokom prve ili druge nedelje marta, maja i jula. Krv je uzimana uvek u isto vreme, ali u različitim uzastopnim danima, kako bi se utvrdila veza sa THI indeksom. Koncentracija serumskog HSP70 određena je metodom kompetitivne inhibicione ELISA tehnike. Korišćen je standardni kit proizvođača Cusabio (PRC), a čitač i ispirać od proizvođača Rayto (PRC).

Ispitivanje indeksa opterećenja toplotnim stresom – Termalni komfor krava određen je izračunavanjem indeksa temperature i vlažnosti (THI indeks, eng. temperature humidity index) pomoću sledeće formule $THI = (1,8 \times \text{Temperatura}) - (1 - \text{Vlažnost}) \times (\text{Temperatura} - 14,3) + 32$. Podaci o temperaturi i vlažnosti dobijeni su iz zvaničnih izveštaja Hidrometeorološkog zavoda Srbije. U obzir su uzete temperature i vlažnosti izmerene u 14 časova.

Analiza podataka – Uticaj meseca na vrednost Hsp70 i THI indeksa određena je pomoću ANOVA analize. Ispitana je

linearnost regresije i korelacije između Hsp70 i THI pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije. Za analizu i predstavljanje rezultata korišćen je Microsoft Office Excel paket.

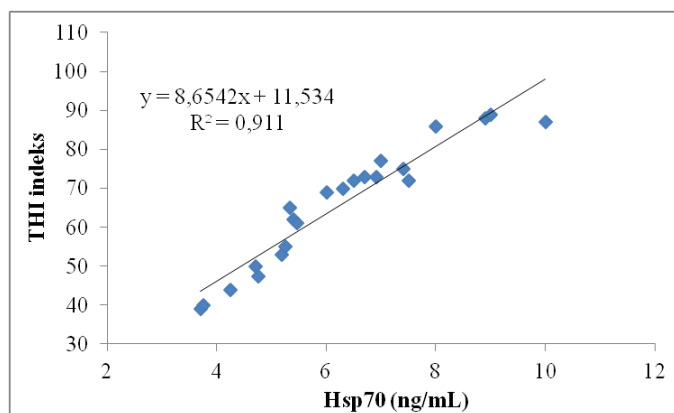
REZULTATI

Koncentracija Hsp70 kod ispitivanih krava imala je sledeće vrednosti: $4,75 \pm 1,1$ ng/mL u martu; $6,05 \pm 1,4$ ng/mL u maju i $8,9 \pm 2,3$ ng/mL u julu. Indeks opterećenosti krava toplotnim stresom (THI) u okviru ispitivane sezone kretao se od 55,6 u martu, 66,9 u maju do 75,6 u julu mesecu (Tabela 1). Koncentracija Hsp70 i THI indeks bili su značajno viši kako se ide od proleća ka letu. Rezultati ispitivanja pokazuju porast koncentracije Hsp70 sa porastom THI indeksa.

Nađena je pozitivna i odlična korelacija između serumske Hsp70 i vrednosti THI indeksa (Grafikon 1).

Tabela 1: Koncentracija Hsp70 u krvi krava i indeks toplotnog stresa (THI)

| | Mart ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) | Maj ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) | Jul ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) | p |
|-------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------|
| HSP70 | $4,75 \pm 1,1$ | $6,05 \pm 1,4$ | $8,9 \pm 2,3$ | <0,001 |
| THI | $55,6 \pm 4,1$ | $66,9 \pm 6,2$ | $75,6 \pm 7,1$ | <0,05 |



Grafikon 1: Korelacija i regresija Hsp70 i THI

DISKUSIJA

Postoje brojni faktori koji utiču na koncentraciju Hsp70 u serumu krava, kao što su starost i stadijum laktacije. Koncentracija

Hsp72 je viša u prvih 60 dana laktacije u odnosu na kasniju laktaciju (48). Međutim, koncentracija Hsp72 je značajno niža kod

krava pred partus i u prvim nedeljama posle partusa, da bi potom rasla (49). Ovo ukazuje na postojanje određenih specifičnosti u regulaciji ekstracelularnog Hsp72 kod krava. Kod mlečnih krava postoji pozitivna korelacija između vrednosti ekstracelularnog i intracelularnog Hsp72.

U malom broju istraživanja ispitana je veza peripartalnog metaboličkog stresa sa vrednostima čaperona. Koncentracija NEFA (neesterifikovanih masnih kiselina) u peripartalnom periodu pokazuju pozitivnu korelaciju sa koncentracijom Hsp72 (48). Cincović i Belić (50) su pokazali da je koncentracija Hsp70 bila značajno viša u nedeljama posle teljenja u odnosu na nedelju pre teljenja. Viša koncentracija NEFA i BHB (beta-hidroksibutirata) nađena je u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na ostali period. Koncentracija Hsp70 pozitivno korelira sa vrednostima NEFA i BHB. Parcijalna korelacija pokazuje da su veze jače u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja. Metabolički stres povećava koncentraciju Hsp70 u krvi tokom rane laktacije.

Sa druge strane, stvaranje intracelularnog Hsp72 pod dejstvom toplotnog stresa smanjuje insulinsku rezistenciju i smanjuje akumulaciju masti u hepatocitima (51). Koncentracija Hsp72 u leukocitima i plazmi naglo rastu nakon telenja i koreliraju sa NEFA, glukozom i TNF α (48).

U istraživanju Li Min (52) pokazano je da mlečne krave izložene blagom toplotnom

stresu i krave u kontrolnoj grupi, imaju značajno niže vrednosti HSF i Hsp70 ($P < 0,05$) u odnosu na krave izložene visokim vrednostima toplotnog šoka. Porast koncentracije HSF i Hsp može poslužiti kao brzi zaštitni mehanizam protiv toplotnog stresa za održavanje homeostaze. Naime, kao što se i očekivalo, nivoi HSF, Hsp27, Hsp70 i Hsp90 u serumu značajno su porasli tokom toplotnog stresa ($P < 0,05$) (52).

ZAKLJUČAK

Toplotni stres kod mlečnih krava je veoma važan faktor, koji smanjuje održivost proizvodnje mleka i njenu isplativost. Rezultati ispitivanja pokazuju da je koncentracija HSP70 kod ispitivanih krava imala sledeće vrednosti: $4,75 \pm 1,1$ ng/mL u martu; $6,05 \pm 1,4$ ng/mL u maju i $8,9 \pm 2,3$ ng/mL u julu. Indeks opterećenosti krava toplotnim stresom (THI) u okviru ispitivane sezone kretao se od 55,6 u martu, 66,9 u maju do 75,6 u julu mesecu. Koncentracija Hsp70 i THI indeks bili su značajno viši kako se ide od proleća ka letu. Rezultati ispitivanja pokazuju porast koncentracije Hsp70 sa porastom THI indeksa. Nađena je pozitivna korelacija između serumske Hsp70 i vrednosti THI indeksa. U odgovoru organizma na toplotni stres, THI i Hsp70 mogu služiti kao veoma značajni pokazatelji.

LITERATURA

1. Petrović M.Ž., Cincović M.R., Belić B., Đoković R., Starić J., Ježek J. Koncentracija proteina toplotnog stresa (Heat shock protein 70, Hsp70) u krvnom serumu kod krava u ranoj laktaciji. 27. Savetovanje veterinarara Srbije, 8-11.09, Zlatibor, 2016., pp 235-238
2. Petrović M.Ž., Đoković R., Cincović M., Belić B., Petrović M., Kurćubić V., Ilić Z., Radinović M. Family of heat shock proteins of 70 kDa in the peripartal period in dairy cows. IX International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2018", October 04 – 07, Jahorina, 2018., p. 1063.
3. Petrović M.Ž., Đoković R., Cincović M., Belić B., Petrović M., Kurćubić V., Ilić Z., Radinović M. The function of heat shock protein hsp70 in dairy cows in early lactation. IX International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2018", October 04 – 07, Jahorina, 2018, p. 1064.
4. Petrović M., Cincović M.R., Đoković R., Starić J., Belić B., Ježek J. Povezanost proteina toplotnog šoka HSP70 sa inflamacijom i insulinskom rezistencijom - implikacije kod mlečnih krava. Zbornik radova i kratkih sadržaja. 28. Savetovanje veterinarara Srbije, 7-10 septembar, Zlatibor, 2017, pp 153-157.

5. Petrović M.Ž., Đoković R., Petrović M.D., Kurćubić V., Cincović M.R., Belić B., Ilić Z., Karabasil N. Importance of intracellular and extracellular protein hsp70 in peripartur period in dairy cows. 7th International Symposium on Agricultural Sciences "AgroReS 2018" February 28 – March 2, Banja Luka, 2018, p 109.
6. Petrović M.Ži., Đoković R., Ilić Z., Kurćubić V., Cincović M. Bogosavljević-Bošković S., Karabasil N., Petrović M.D. Function and importance of HSP 70 in metabolic stress in dairy cows in peripartur period. The Balkans Scientific Center of the Russian Academy of Natural Sciences. 1st International Symposium: Modern Trends in Agricultural Production and Environmental Protection. July 02-05. Tivat, 2019, pp 379-396.
7. Purwanto B.P., Abo Y., Sakamoto R., Furumoto F., Yamamoto S. Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. *J. Agric. Sci* 1990, 114:139.
8. Silanikove N. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research* 2000, 35:181–193.
9. Kadzere C., Murphy M., Silanikove N., Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 2002, 77:59-91.
10. Collier R.J., Baumgard L.H., Lock A.L., Bauman D.E. Physiological limitations, nutrient partitioning. In *Yield of farmed species. Constraints and opportunities in the 21st Century* (ed. R Sylvester-Bradley and J Wiseman), pp. 351–377. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2005.
11. Spiers D.E., Spain J.N., Sampson J.D., Rhoads R.P. Use of physiological parameters to predict milk yield and feed intake in heat-stressed dairy cows. *J. Therm. Biol.* 2004, 29:759–764.
12. Cincović, M.R. Toplotni stres krava – fiziologija i patofiziologija, Monografija, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2010.
13. Majkić M., Cincović M.R., Belić B., Plavša N. Indeks termalnog komfora (THI) krava u letnjim mesecima od 2005 do 2016 godine na teritoriji AP Vojvodine. Zbornik radova XXII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 10-11.03.2017., Čačak, 2017, pp737-742.
14. Cincović M. Metabolički stres krava. Monografija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu, 2016.
15. West J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci* 2003, 86:2131–2144.
16. Rhoads M.L., Rhoads R.P., VanBaale M.J., Collier R.J., Sanders S.R., Weber W.J., Crooker B.A., Baumgard L.H. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci* 2009, 92:1986–1997.
17. DeShazer J., Hahn A., LeRoy G., Hongwei X. Chapter 1: Basic Principles of the Thermal Environment and Livestock Energetics Agricultural and Biosystems Engineering Publications 2009, Paper 234.
18. Bjerre -Harpoth V., Friggens N., Thorup V., Larsen T., Damgaard B., Ingvarsen K., Moyes K. Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* 2012, 95:2362-2380
19. Abeni F., Calamari L., Stefanini L. Metabolic conditions of lactating Friesian cows during the hot season in the Po valley. Blood indicators of heat stress. *International journal of biometeorology* 2007, 52:87-96
20. Cincović M., Belić B. Metabolička adaptacija na peripartalni i toplotni stress kod mlečnih krava. *Veterinarski žurnal Republike Srpske* 2011, 11:155-159.
21. Majkić M., Cincović M.R., Belić B., Plavša N., Lakić I., Radinović M. Relationship between milk production and metabolic adaptation in dairy cows during heat stress. *Acta agriculturae Serbica* 2017, 22(44):123-31.
22. Majkić M., Cincović M.R., Belić B., Plavša N., Hristov S., Stanković B., Popović Vranješ A. Variations in milk production based on the temperature-humidity index and blood metabolic parameters in cows during exposure to heat stress. *Animal Science Papers and Reports*. 2018;36(4):359-69.

23. Vranic P., Milutinovic S. From local sustainable development towards climate change adaptation: a case study of Serbia. *International Journal of Sustainable Development World Ecology* 2016, 23:71-82.
24. Dikmen S., Hansen P.J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *J. Dairy Sci* 2009, 92:109-116.
25. Ravagnolo O., Misztal I. Genetic component of heat stress in dairy cattle, parameter estimation. *J Dairy Sci* 2000, 83:2126–2130.
26. Polsky L., von Keyserlingk M.A. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of dairy science* 2017, 100(11):8645-57.
27. Cincović M.R., Majkić M., Belić B., Plavša N., Lakić I., Radinović M. Thermal comfort of cows and temperature humidity index in period of 2005-2016 in Vojvodina region (Serbia). *Acta Agriculturae Serbica* 2017, 22(44):133-45.
28. Cincović M., Belić B. Uticaj termalnog stresa krava na količinu i kvalitet proizvedenog mleka. *Veterinarski žurnal Republike Srpske* 2009, 9: 53-56.
29. Hristov S., Stanković B., Joksimović-Todorović M., Bojkovski J., Davidović V. Uticaj toplotnog stresa na proizvodnju mlečnih krava. *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik* 2007, 13(3-4):47-54.
30. Bernabucci U., Lacetera N., Baumgard L.H., Rhoads R.P., Ronchi B., Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. *Animal* 2010, 4(7):1167-1183.
31. Johnson H.D. Bioclimate effects on growth, reproduction and milk production. In: Johnson, H.D. (Ed.), *Bioclimatology and the adaptation of livestock*. Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 35-57.
32. Cincović M.R., Belić B.M., Toholj B.D., Radović I.V., Vidović B.R. The influence of THI values at different periods of lactation on milk quality and characteristics of lactation curve. *Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)* 2010, 55(3):235-41.
33. St-Pierre N., Cobanov B., Schnitkey G., Economic losses from heat stress by us livestock industries. *J. Dairy Sci.* 2003, 86:E52-E77.
34. Bernabucci U., Biffani S., Buggiotti L., Vitali A., Lacetera N., Nardone A. The effects of heat stress in italian Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2014, 97(1):471-486.
35. Wheelock, J.B., Rhoads, R.P., Vanbaale, M.J., Sandrers S.R., Baumgard L.H. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2010, 93(2):644-655.
36. Berman A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 2005, 83(6):1377-1384.
37. Collier, R.J, Collier, J.L, Rhoads, R.P., Baumgard L.H. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J. Dairy Sci.* 2008, 91(2):445-454.
38. Kavanagh K., Flynn D.M., Jenkins K.A., Zhang L., Wagner J.D. Restoring HSP70 deficiencies improves glucose tolerance in diabetic monkeys. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2011, 300(5):E894-901.
39. Gaughan J.B., Bonner S.L., Loxton I., Mader T.L. Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2013, 91(1):120-129.
40. Trinklein N.D., Murray J.I., Hartman S.J., Botstein D., Myers R.M. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol. Biol. Cell* 2004, 15(3):1254-1261.
41. Page T.J., Sikder D., Yang L., Pluta L., Wolfinger D.R., Kodadek T., Tomas S.R. Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. *Mol. Biosyst.* 2006, 2(12):627-639.
42. Feder M.E., Hofmann, G.E., Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 1991, 61(1):243-282.
43. Lee W.C., Wen H.C., Chang C.P., Chen M.Y., Lin M.T. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock and cerebral ischemia during heat stroke. *Journal of Applied Physiology* 2006, 100:2073–2082.
44. Edwards J.L., Hansen P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology of Reproduction* 1996, 55:341–346.

45. Edwards J.L., Ealy A.D., Monterroso V.H., Hansen P.J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development* 1997, 48:25–33.
46. Rivera R.J., Kelley K.L., Erdos G.W., Hansen P.J. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biology of Reproduction* 2003, 69:2068–2077.
47. Maloyan A., Horowitz M. Beta-adrenergic signaling and thyroid hormones affect Hsp72 expression during heat acclimation. *Journal of Applied Physiology* 2002, 93:107–115.
48. Catalani E., Amadori M., Vitali A., Bernabucci U., Nardone A., Lacetera N. The Hsp72 response in peri-parturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters. *Cell Stress & Chaperones* 2010, 15(6): 781-790.
49. Kristensen T.N., Løvendahl P., Berg P., Loeschcke V. Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes. *Cell Stress & Chaperones* 2004, 9(2):143–9.
50. Cincović M., Belić B. Concentration of blood Hsp70 and its relation with lipid mobilisation and ketogenesis in dairy cows during periparturient period. *Contemporary agriculture* 2014, 63(1-2):92-7.
51. Morino S., Kondo T., Sasaki K., Adachi H., Suico M.A., Sekimoto E., Matsuda T., Shuto T., Araki E., Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PLoS one*. 2008, 3(12).
52. Min L., Cheng J.B., Shi B.L., Yang H.J., Zheng N., Wang J.Q. Effects of heat stress on serum insulin, adipokines, AMP-activated protein kinase, and heat shock signal molecules in dairy cows. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2015, 16(6):541-548