

**INTRACELULARNI I EKSTRACELULARNI HSP70 KOD KRAVA – SLIČNOSTI I RAZLIKE U
FIZIOLOŠKIM I PATOFIZIOLOŠKIM USLOVIMA**

**INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR HSP70 IN COWS - SIMILARITIES AND
DIFFERENCES IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGY CONDITIONS**

**Miloš Ži. Petrović^{a*}, Radojica Djoković^a, Vladimir Kurćubić^a, Snežana Bogosavljević Bošković^a,
Simeon Rakonjac^a, Milun D. Petrović^a**

^aAgronomski fakultet Čačak, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

*Corresponding author: petrovic.milos87@yahoo.com



M.Ži.P. <https://orcid.org/0000-0002-4707-6796>, R.Dj. <https://orcid.org/0000-0003-0900-3227>, V.K. <https://orcid.org/0000-0003-2016-7345>,
S.B.B. <https://orcid.org/0000-0002-8200-1415>, S.R. <https://orcid.org/0000-0002-1232-1755>, M.D.P. <https://orcid.org/0000-0001-8187-0785>

SAŽETAK

Proteini toplotnog šoka (Hsp) nazivaju se još i čaperoni / šaperoni predstavljaju proteine koji su neizostavni za pravilno formiranje polipeptidnog lanca; i imaju ulogu u njegovoj translokaciji u okviru ćelije. Hsp70 u ćelijama pomaže u ponovnom uspostavljanju native konformacije proteina koji su se denaturisali pod dejstvom različitih stresogena, tako što sprečava njihovu agregaciju, što za rezultat ima čuvanje ćelije od apoptoze i imaju antiinflamatorni efekat. Ovi proteini su klasifikovani na osnovu molekularne mase, a najznačajniji je heat shock protein 70 (Hsp70) molekularne mase oko 70 kDa, koji je označen kao “a master player in protein homeostasis”. Koncentracija Hsp značajno raste prilikom izlaganja nekom stresoru koji potiče iz same ćelije ili iz spoljašnje sredine. Mnogi čaperoni su indukovani pod dejstvom visokih ambijentalnih temperatura, kada se razvija univerzalni odgovor toplotnog šoka (HSR), pa je zbog toga definisan naziv heat shock proteins. Intracelularni Hsp70 (iHsp70) pokazuje svoje protektivno i antiinflamatorno dejstvo. Indukovani iHsp70 štiti ćeliju od apoptoze tako što redukuje ili blokira aktiviranje kaspaza, vezuje se za apoptozu-indukujući faktor (AIF) i inhibira AIF-indukovanu kondenzaciju hromatina ili onemogućuje oštećenje mitohondrija i fragmentaciju jedra. On blokira morfološke promene kod ćelije koje su izazvane apoptozom indukovanom pomoću tumor necrosis faktora, a nađeno je da pomaže u reparaciji ćelije prilikom oštećenja koje je izazvano inflamacijom. Antiinflamatorni efekat iHsp70 ogleda se u tome što inhibira odgovor na lipopolisaharide i blokira produkciju inflamatornih medijatora kao što je faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), a opisani su i drugi mehanizmi. Ekspresija gena za produkciju Hsp70 je dobro izučena kod preživara ili njihovih ćelijskih kultura koje su izlagani visokim ambijentalnim temperaturama, a višestruki porast iHsp70 u ćelijama daje bolju adaptaciju na toplotni stres. Izučavanje eHsp70 je postalo aktuelno zbog dostupnih dijagnostičkih kitova za određivanje njegove koncentracije, a najnoviji rezultati pokazuju da je on veoma koristan prediktor mortaliteta kod pacijenata u septičnom šoku. Hsp70 prelazi u ekstracelularni prostor na nekoliko načina: izlaskom iz nekrotičnih ćelija, pod delovanjem različitih stresnih faktora i inflamacije kod neoštećenih ćelija, može biti produkovan u jetri kao protein akutne faze, a opisan je i transport egzozomima i direktan kontakt sa lipidnom membranom ćelija. Proinflamatorni efekat eHsp70 ostvaruje tako što indukuje imunološke ćelije, što dalje indukuje sekreciju inflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6), inducibilnu azot oksid sintazu (iNOS) ekspresiju i nuklearnu translokaciju nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B). Prema teoriji bilansa čaperona, što je vrednost eHsp70 viša u odnosu na iHsp70, to su njegova proinflamatorna delovanja izraženija. Ova hipoteza je potvrđena i kod mlečnih krava u peripartalnom periodu.

Ključne reči: krave, protein toplotnog šoka, inflamacija, metabolizam.

ABSTRACT

Heat shock proteins (Hsp), also called chaperones, are proteins that are indispensable for the proper formation of the polypeptide chain; and have a role in its translocation within the cell. Hsp70 in cells helps to re-establish the native conformation of proteins that have denatured under the influence of various stressors, by preventing their aggregation, which results in protecting the cell from apoptosis and having an anti-inflammatory effect. These proteins are classified on the basis of molecular mass, and the most significant is heat shock protein 70 (Hsp70) with a molecular mass of about 70 kDa, which is designated as "a master player in protein homeostasis". The concentration of Hsp increases significantly when exposed to a stressor originating from the cell itself or from the external environment. Many chaperones are induced under the influence of high ambient temperatures, when the universal heat shock response (HSR) develops, which is why the name heat shock proteins was defined. Intracellular Hsp70 (iHsp70) shows its protective and anti-inflammatory effects. Induced iHsp70 protects the cell from apoptosis by reducing or blocking the activation of caspases, binding to apoptosis-inducing factor (AIF) and inhibiting AIF-induced chromatin condensation or preventing mitochondrial damage and nuclear fragmentation. It blocks cell morphological changes caused by tumor necrosis factor-induced apoptosis, and has been found to aid in cell repair of damage caused by inflammation. The anti-inflammatory effect of iHsp70 is reflected in the fact that it inhibits the response to lipopolysaccharides and blocks the production of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and other mechanisms have been described. The expression of the gene for the production of Hsp70 has been well studied in ruminants or their cell cultures exposed to high ambient temperatures, and the multiple increase of iHsp70 in the cells results in a better adaptation to heat stress. The study of eHsp70 has become relevant due to the availability of diagnostic kits for determining its concentration, and the latest results show that it is a very useful predictor of mortality in patients with septic shock. Hsp70 moves to the extracellular space in several ways: after leaving necrotic cells, under the action of various stress factors and inflammation in undamaged cells, it can be produced in the liver as an acute phase protein, and transport by exosomes and direct contact with the lipid membrane of cells have also been described. The pro-inflammatory effect of eHsp70 is realized by inducing immune cells, which further induces the secretion of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nuclear translocation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). According to the chaperone balance theory, the higher the value of eHsp70 compared to iHsp70, the more pronounced its pro-inflammatory effects. This hypothesis was also confirmed in dairy cows in the periparturient period.

Key words: cow, heat shock proteins, inflammation, metabolism.

DEFINICIJA PROTEINA TOPLOTNOG ŠOKA I NJIHOVA ULOGA

Proteini toplotnog šoka (eng., *Heat shock proteins*, Hsp) nazivaju se još i čaperoni / šaperoni predstavljaju proteine koji su neizostavni za pravilno formiranje polipeptidnog lanca; i imaju ulogu u njegovoj translokaciji u okviru ćelije. Hsp70 u ćelijama pomaže u ponovnom uspostavljanju native konformacije proteina koji su se denaturisali pod dejstvom različitih stresogena, tako što sprečava njihovu agregaciju, što za rezultat ima čuvanje ćelije od apoptoze i imaju antiinflamatorni efekat. Pored navedenog, novija istraživanja koji se tiču ekstraćelijskog, cirkulišućeg Hsp70 govore u prilog činjenici da ovaj šaperon ima proinflamatornu ulogu,

slično citokinima, ali i da poboljšava nadzor protiv tumorskih ćelija.

Proteini toplotnog šoka (Hsp) su molekularni čaperoni koji imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze proteina u ćeliji (protostaza) (1). Oni sprečavaju pogrešno savijanje i agregaciju proteina, što se postiže njihovim delovanjem na intermedijere savijanja (2-4). Ovi proteini su klasifikovani na osnovu molekularne mase, a najznačajniji je heat shock protein 70 (Hsp70) molekularne mase oko 70 kDa, koji je označen kao "a master player in protein homeostasis" (5). Koncentracija Hsp značajno raste prilikom izlaganja nekom stresoru koji potiče iz same ćelije ili iz spoljašnje sredine. Mnogi čaperoni su indukovani pod dejstvom visokih ambijentalnih temperatura, kada se razvija univerzalni odgovor toplotnog šoka

(HSR), pa je zbog toga definisan naziv heat shock proteins (6,7). Intracelularni Hsp70 (iHsp70) pokazuje svoje protektivno i antiinflamatorno dejstvo. Indukovani iHsp70 štiti ćeliju od apoptoze tako što redukuje ili blokira aktiviranje kaspaza, vezuje se za apoptozu-indukujući faktor (AIF) i inhibira AIF-indukovanu kondenzaciju hromatina ili onemogućuje oštećenje mitohondrija i fragmentaciju jedra (8,9). On blokira morfološke promene kod ćelije koje su izazvane apoptozom indukovanom pomoću tumor necrosis faktora, a nađeno je da pomaže u reparaciji ćelije prilikom oštećenja koje je izazvano inflamacijom (10,11). Antiinflamatorni efekat iHsp70 ogleda se u tome što inhibira odgovor na lipopolisaharide i blokira produkciju inflamatornih medijatora kao što je faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), a opisani su i drugi mehanizmi (12). Ekspresija gena za produkciju Hsp70 je dobro izučena kod preživara ili njihovih ćelijskih kultura koje su izlagani visokim ambijentalnim temperaturama, a višestruki porast iHsp70 u ćelijama daje bolju adaptaciju na toplotni stres (13-15).

INTRACELULARNA I EKSTRACELULARNA ULOGA HSP70

Hsp70 se deketuje u ćelijama, ali i u krvnom serumu, a u zavisnosti od lokalizacije on ima sposobnost da ispolji potpuno drugačije fiziološke efekte (16). Hsp70 u cirkulaciju dolazi putem dva mehanizma. Prvi mehanizam podrazumeva pasivan ulazak Hsp70 u krvotok koji je poreklom od nekrotičnih ili stresom opterećenih ćelija, dok drugi mehanizam uključuje aktivno lučenje Hsp u krvotok od strane različitih ćelija (17-19). Nema jasnih saznanja o tome koji deo Hsp u krvotok dolazi aktivnim, a koji deo pasivnim putem. Kontradiktorna uloga i ekspresija Hsp u različitim patofiziološkim procesima i stanjima dodatno otežava ovu interpretaciju. Naime, njegova koncentracija raste u različitim bolestima, a sa druge strane povećanje koncentracije znači i bolje preživljavanje, dok u određenim okolnostima smanjena produkcija Hsp dovodi do različitih metaboličkih poremećaja kod ljudi (20). Hsp70 stimuliše imuni odgovor, ali i vrši njegovu inhibiciju da previše jaka imunološka stimulacija ne bi dovela do oštećenja tkiva domaćina. Njegova uloga u patologiji ali i protekciji ćelija, te razlika u koncentracijama i ekspresiji u različitim bolestima i dalje zbunjuje kada pokušamo da formiramo

jedinstvenu zakonitost o delovanju pa i poreklu Hsp70 u sistemskoj cirkulaciji.

Intracelularni HSP (iHsp70) ima snažan antiinflamatorni efekat, dok ekstracelularni HSP (eHsp70) ima suprotnu ulogu, indukujući aktivaciju nekoliko proinflamatornih puteva. Ekstracelularni eHsp70 dolazi u krvotok iz živih ćelija koje su izložene stresu najverovatnije putem putem vezikularne sekrecije, egzozoma ili lizozoma i preko intaktne lipidne membrane koji su nezavisni od transporta proteina preko sistema endoplazmatski retikulum-Goldžijev aparat, dok pasivnim putem dolazi iz oštećenih i nekrotičnih ćelija (21). Više inflamatornih puteva može biti pokrenuto kao posledica izloženosti ekstracelularnom eHsp70, najverovatnije putem njegovog vezivanja za Toll receptore na membranama ćelija (22,23). Sa druge strane, intracelularni iHsp70 vrši blokiranje aktiviranja nuklearnog faktora κ B (NF- κ B), čime postiže svoj antiinflamatorni efekat (24). NF- κ B je opšti transkripcioni faktor koji je neophodan za pokretanje inflamatornih odgovora na različite signale, a otkriven je u B-limfocitima (25-27). Kod inflamatornog odgovora jetre, kao značajnog organa za proizvodnju proteina akutne faze i citokina od velikog značaja je povezivanje iHSP70 sa NF- κ B/I κ B kompleksom u citosolu hepatocita čime se sprečava transkripcija TNF α i inducibilnih gena azot-oksida sintaze, čime se postiže antiinflamatorni efekat šaperona (28). Preživljavanje ćelija je omogućeno posle inhibicije c-Jun N-terminal kinase-(JNK-) transdukcije signala koju vrši intracelularni Hsp70 posle njegovog povećanog stvaranja tokom stresnog odgovora (29). Zaštita ćelija u osnovi ima inhibiciju apoptoze koja se postiže na nekoliko načina. iHSP70 sprečava aktiviranje kaspaza, povećava ekspresiju Bcl-2 i inhibira otpuštanje citohroma C, a kod infarkta mozga povećana ekspresija ovog proteina toplotnog šoka smanjuje veličinu infarkta i apoptozu (30-33). Hsp70 smanjuje oksidativni stres (34), a cikloopenonski prostaglandini (cp-PGs), koji pod određenim okolnostima mogu izazvati ekspresiju Hsp70 i na taj način postaju moćni antiinflamatorni medijatori (35-37). Intraćelijski Hsp70 pokazuje i interferenciju sa proinflamatornim citokinima, što se postiže na nivou gena gde region gena koji promiće TNF- α sadrži HSF1 vezujuće mesto koje potiskuje TNF α transkripciju, što znači da će aktivacijom HSF1 doći do smanjene ekspresije TNF α , što može biti postupak antiinflamatornog delovanja (38,39). Međutim, ovaj proces je dvosmeran, pa TNF α može

zaustaviti aktivaciju HSF1 (40-42). Zbog ovakvih relacija na genskom nivou indukcija Hsp72 (HSPA1A) smanjuje ekspresiju gena za citokine kao što su TNF α , IL-1, IL-12, IL-10 i IL-18 (43). Za razliku od intracelularnih iHsp70, dokazano je da eHSP70 ima velikog značaja u inflamatornim reakcijama, što ostvaruje putem transdukcije MyD88/IRAK/NF- κ B signala posle vezivanja sa Tool-like receptorom 2 (TLR2) i TLR4, putem CD14-zavisnih reakcija (44,45), čime se promoviše urođena imunološka aktivacija (46). eHSP70 ima parakrinu ulogu u krvotoku (47). eHSP70 indukuje signale koji daju tipičan proinflamatorni odgovor uz povećano stvaranje NO i proinflamatornih citokina TNF- α i interleukin 1 beta (IL-1 β) (48). eHSP70 je u pozitivnoj korelaciji sa klinički značajnim pokazateljima inflamacije kao što su CRP, fibrinogen i broj monocita (49).

Hsp70 ima dvojnju ulogu u organizmu u zavisnosti od toga da li je lociran intra- ili ekstracelularno, tako da iHsp70 ima zaštitnu ulogu, a eHsp70 ima proinflamatornu ulogu. Izučavanje eHsp70 je postalo aktuelno zbog dostupnih dijagnostičkih kitova za određivanje njegove koncentracije, a najnoviji rezultati pokazuju da je on veoma koristan prediktor mortaliteta kod pacijenata u septičnom šoku (50). Hsp70 prelazi u ekstracelularni prostor na nekoliko načina: izlaskom iz nekrotičnih ćelija, pod delovanjem različitih stresnih faktora i inflamacije kod neoštećenih ćelija, može biti produkovan u jetri kao protein akutne faze, a opisan je i transport egzozomima i direktan kontakt sa lipidnom membranom ćelija (51,52). Proinflamatorni efekat eHsp70 ostvaruje tako što indukuje imunološke ćelije, što dalje indukuje sekreciju inflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6), inducibilnu azot oksid sintazu (iNOS) ekspresiju i nuklearnu translokaciju nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) (53). Prema teoriji bilansa čaperona, što je vrednost eHsp70 viša u odnosu na iHsp70, to su njegova proinflamatorna delovanja izražena (54).

HSP70 I PERIPARTALNI PERIOD KOD KRAVA

Prvi radovi u određivanju Hsp70 u krvi kod mlečnih krava - Kada se radi o mlečnim kravama u našim uslovima je ispitivana koncentracija Hsp70 kod krava u peripartalnom periodu (55). Koncentracija Hsp70 iznosila je $3,2 \pm 0,93$ ng/mL u prvoj nedelji posle teljenja, odnosno $3,7 \pm 0,88$ u drugoj, da bi u četvrtoj i osmoj nedelji iznosila oko

5,5 ng/mL. Vreme posle teljenja pokazuje značajan statistički uticaj na vrednost ovog čaperona u krvi ($F=15,8$; $p<0,01$). Nađeno je da je koncentracija Hsp70 statistički značajno niža u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na četvrtu i osmu. Ove vrednosti kao i njihov trend slažu se sa ranijim rezultatima (56,57). 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. Međutim, koncentracija Hsp72 je značajno niža kod krava pred partus i u prvim nedeljama posle partusa, da bi potom rasla. Ovo ukazuje na postojanje određenih specifičnosti u regulaciji ekstracelularnog Hsp72 kod krava u peripartalnom periodu. 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. Cincović i Belić (55) 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 ostale periode. Koncentracija Hsp70 pozitivno korelira sa vrednostima NEFA i BHB. Parcijalna korelacija pokazuje da su veze jače u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja, što je period kada su lipidna mobilizacija i ketogeneza najizraženije. Koncentracija Hsp70 u prve dve nedelje posle teljenja je zavisna od nivoa lipidne mobilizacije i ketogeneze. Metabolički stres koji se odlikuje lipidnom mobilizacijom i ketogenezom povećava koncentraciju Hsp70 u krvi tokom rane laktacije.

Promena koncentracije Hsp70 u funkciji graviditeta i porođaja je opisana u funkciji brojnih fizioloških i patoloških faktora koji postoje u periodu oko porođaja (58). Koncentracija Hsp70 je niža tokom trudnoće, u odnosu na žene koje nisu trudne (59). Sam partus indukuje stvaranje Hsp, jer je kod ovaca utvrđeno da postoji povećana ekspresija Hsp72 mRNA u mišićnom sloju materice tokom jagnjenja (60). Kod žena u amnionskoj tečnosti takođe raste koncentracija ovog šaperona kod žena koje su imale fiziološki porođaj (61). Kada se radi o mlečnim kravama, Kristensen i sar. (62) su pokazali da stadijum laktacije utiče na koncentraciju HSP72 u krnoj plazmi krava. Koncentracija Hsp72 u

plazmi je bila veća u ranoj laktaciji u poređenju sa ostalim delovima laktacije, mada ove razlike nisu bile statistički signifikantne. Posmatrajući prve postpartalne nedelje nalazimo nižu koncentraciju eHSP70 u prvih dve nedelje nakon teljenja u odnosu na 4. i 8. nedelju (63). Još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi koji dovode do različitog uticaja perioda laktacije na stvaranje proteina toplotnog šoka. Jedan od rezultata ukazuje da smanjen unos hrane u odnosu na potrebe, što je karakteristika peripartalnog perioda kod krava. U tom periodu se dešavaju promene u metabolizmu ugljenih hidrata i masti koje mogu uticati na stvaranje Hsp u različitim tkivima. Nađeno je da prolongirano unošenje manje energije nego što je potrebno dovodi do povećane produkcije Hsp90, međutim nisu utvrđene promene u mesendžernoj RNK u leukocitima, dok je ekspresija Hsp70 u somatskim ćelijama bila smanjena. Dostupnost ugljenih hidrata tokom izlaganja stresu u vidu fizičkog napora smanjuje Hsp70 u cirkulaciji, što ukazuje da dostupnost glukoze kao glavnog energenta smanjuje ekstracelulatne proteine toplotnog šoka, pa samim tim i njihovo potencijalni proinflamatorni efekat (64). Sa druge strane, povećano stvaranje Hsp72 tokom toplotnog stresa dovodi do povećanog korišćenja glukoze u energetske svrhe i smanjuje akumulaciju lipida u hepatocitima (65). Koncentracije Hsp72 u leukocitima i plazmi brzo rastu posle teljenja i koreliraju sa koncentracijama NEFA, glukoze i TNF α (66). Povezanost sa osnovnim metaboličkim procesima i inflamatornim odgovorom dovodi do razmatranja značaja Hsp u procesu nastanka insulinske rezistencije, koja se nalazi u osnovi metaboličkih promena kod krava u peripartalnom periodu. Kod ljudi obolelih od dijabetesa tipa 2 postoji smanjena ekspresija mRNA za intracelularni Hsp72 u skeletnim mišićima, dok terapije i procedure koje podižu nivo ovog šaperona prevenira nastanak hiperglikemije, hiperinsulinemije, intolerancije na glukozu i insulinske rezistencije kod gojaznosti (67-69). Na modelu gojaznosti je ispitan i uticaj hronične inflamacije koja prati povećanu zastupljenost masnog tkiva. Naime, pokazano je da inflamacija uz stalnu aktivaciju NLRP3 vrši supresiju HSF-1/iHSP70 ose, čime se smanjuje ekspresija HSF-1 sa posledičnim povećanim ćelijskim starenjem i bržim propadanjem. Na osnovu navedenog zaključujemo da intracelularni protein toplotnog šoka Hsp70 ima antiinflamatorno i proinsulinsko delovanje. Ekstracelularni Hsp70

pokazuje suprotne fiziološke efekte pa je u tesnoj vezi sa razvojem inflamacije i diabetes mellitus-a tipa 2. Skeletni mišići i adipozno tkivo kao predstavnici insulin zavisnog tkiva imaju redukovane vrednosti iHsp70 tokom dijabetesa, uz povišene vrednosti eHsp70 (70-73). Kod krava u ranoj laktaciji postoji nedostatak insulina koji je posledica započinjanja laktacije i negativnog energetskog bilansa praćenog sniženom koncentracijom glukoze, što dalje dovodi do povećane lipolize, inflamacije i insulinske rezistencije. Kod krava sa povišenim vrednostima NEFA i sniženim vrednostima insulina nađena je viša koncentracija eHsp70 u nedejama posle teljenja (74). Sve navedeno govori u prilog našoj hipotezi da je Hsp70 značajno uključen u sve metaboličke tokove i adaptacije kod krava u ranoj laktaciji.

Peripartalni period kod mlečnih krava predstavlja model za izučavanje metaboličkog stresa. Metabolički stress kod krava u ranoj laktaciji nastaje kao posledica teljenja i započinjanja laktacije, kada dolazi do promena u metabolizmu kako bi se podržala nadolazeća laktacija. Metabolički stres se odlikuje negativnim energetskim bilansom, povećanom proizvodnjom mleka, usmeravanjem glukoze ka mlečnoj žlezdi, dok se zadovoljavanje energetske potreba drugih tkiva omogućuje kroz lipolizu i ketogenezu, koji utiču na celokupnu metaboličku adaptaciju krava (75,76). Povećan dotok masnih kiselina u jetru, uz pad lipoproteinskog transporta u organizmu dovodi do razvoja masne jetre kod krava i razvoja ketoze (75). Jedini lipogeni hormon u organizmu krava je insulin, čije vrednosti opadaju, a njegovo dejstvo biva inhibirano pod uticajem izražene lipolize i ketogeneze, pa se javlja insulinska rezistencija, koja dodatno stimuliše lipolizu (76). Nastanak lipolize, masne jetre i insulinske rezistencije kod mlečnih krava je usko povezano sa nastankom inflamacije u ranoj laktaciji. Naime, povećana lipoliza kod krava može dovesti do odavanja veće količine proinflamatornih citokina iz masnog tkiva koji se nazivaju adipokini, a najvažniji je TNF- α , što je u vezi sa razvojem insulinske rezistencije i povećanjem aktivnosti lipaza (77). Nađena je povećana aktivnost TNF- α u serumu kod krava sa umerenim do teškim sindromom masne jetre (78). U više eksperimentalnih studija pokazan je direktni uticaj neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) na inflamatorne procese tako što utiče na aktivaciju toll-like receptora (TLR), posebno TLR4. TLR4

aktivacija može da dovede do inflamatornog odgovora uz lučenje proinflamatornih citokina (79,80). Period laktacije i proizvodnja mleka kod krava utiču na vrednosti eHsp70. Tako je nađeno da posle partusa u ranoj laktaciji i sa porastom proizvodnje mleka raste koncentracija eHsp70 u krvnom serumu i salivi kod krava (81-83). Dinamičke promene u vrednosti eHsp70 i TNF- α su gotovo identične kod krava u prvim nedeljama posle teljenja kada postoji metabolički stres, tako da vrednosti oba parametra rastu. Takođe, Hsp70 utiče na mnoge metaboličke tokove koji se tiču energetskeg metabolizma, metabolizma lipida u jetri i insulinske rezistencije, a svoje dejstvo ispoljava preko TLR4 (84,85).

Hsp70 ima velik iznačaj u procesu metabolizma lipida i njegova pozicija je dobro izučena u procesima autofagije i lipolize (86,87). Autofagija je ćelijski proces u kome se proteini i organele razgrađuju kroz lizosome kako bi se održala adekvatna ćelijska homeostaza. Postoje tri načina kako se ostvaruje autofagija: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. Makroautofagija i šaperonima posredovana autofagija zajedno sa sistemima proteaze uključeni su u proces recikliranja ćelijskih proteina. Na ovaj način se regulišu i neutrališu i oni proteini koji mogu da ugroze ćeliju, jer su rezultat genskih aberacija i mutacija. Makroautofagija, ili autofagija u klasičnom smislu, nastaje posle formiranja autofagozoma, a to je dvomembranska vezikularna struktura koja uključuje ono što je potrebno da se razgradi. Posle formiranja autofagozoma, on se spaja sa lizozomom, gde se oslobađa proteolitički materijal kako bi se formirala autolizozomska struktura koja omogućuje konačnu razgradnju onoga što je nepotrebno ćeliji. Pored proteina, na ovaj način se mogu neutralisati različite oštećene organele, endoplazmatski retikulum, peroksizomi, lipidne kapljice, feritin i različiti zimogeni enzimi.

Šaperonima posredovana autofagija podrazumeva učesće Hsc70 i LAMP-2A (protein membrane povezan sa lizozomom 2A). U procesu makro i mikroautofagije nađeno je da šaperonima posredovana autofagija vrši degradaciju citosolnih proteina koji su prethodno bili vezani za Hsc70-specifičnu sekvencu. Od posebnog značaja je proces autofagne degradacije lipidnih kapljica, jer su u vezi sa metabolizmom lipida i značajni su u formiranju linka između poremećaja na nivou lipida i brojnih metaboličkih bolesti. Kapljice lipida u citosolu se

mogu razgraditi pomoću tri autofagna puta kao što postoje tri vrste autofagije. U makrofagiji lipidnih kapljica (makrolipofagija) dolazi do zahvatanja delova lipidnih kapljica ER membranama zavisnim od proteina 1A/1B-lakog lanca 3 (LC3-II) povezanog sa mikrotubulama da bi se formirali lipoautofagozomi koji se zatim spajaju sa lizozomima u autolizosome. Tokom mikrolipofagije, proteini vezani za Ras u mozgu (RAB) olakšavaju protok lipida i proteina od lipidnih kapljica do lizozoma. Lizozomalna kiselipaza (LAL) je jedina poznata lipaza sposobna da hidrolizuje neutralne lipide u kiselim uslovima. Nezavisno od LAL-a, autofagija posredovana šaperonom olakšava transfer posredovan Hsp70 i lizozomsko uzimanje i degradaciju perilipina zavisnu od lizozoma 2 (LAMP2) kako bi se povećala dostupnost citosolnih lipaza za lipidne kapljice. Najčešći stimulans za aktivaciju šaperonima pokrenute autofagije je nedostatak hranljivih materija (ili gladovanje), što je od posebnog značaja kada se razmatra peripartalni period kod krava. Gladovanje aktivira ovaj proces u *in vitro* i *in vivo* uslovima, a smatra se da ovaj proces zavisi od cirkulišućih ketonskih tela.

U ranijem delu teksta je izloženo da postoji velika razlika kada se radi o fiziološkim efektima intra i ekstracelularnih proteina toplotnog šoka i zbog toga je u jednom od značajnijih radova u ovoj oblasti predložena teorija bilansa čaperona, kako bi se u odnosu na dominaciju intra ili ekstracelularnih verzija ovih proteina procenio dominantno pro ili antiinflamatorni odgovor. Masno tkivo posebno u pozitivnom energetskeg bilansu i kod gojaznih jedinki je izvor koji aktivno oslobađa proinflamatorne citokine i adipokine, čime nastaje upala niskog stepena uz aktiviranje upalnih puteva zavisnih od NF- κ B koji dalje dovode do: blokade intracelularnog iHsp70 i insulinske rezistencije, hroničnog oslobađanja proinflamatornog ekstracelularnog eHsp70 iz imunoloških ćelija i razvoj oksidativnog stresa, koji rezultira denaturacijom proteina. eHSP70 se povećava kao neophodan signal opasnosti za borbu protiv oksidativnog oštećenja plazme, ali kada je hronično povišen on indukuje dalju imunološku aktivaciju i proinflamatorni odgovor i aktivira toll-like receptore (TLR) i inflamatorni put koji dovodi do smanjenja aktivacije HSF-1 i na kraju do smanjenog intracelularnog iHsp70. Niži iHsp70 uzrokuje smanjenu insulinsku osetljivost, intenziviranje aktivacije i upale NF- κ B i smanjeni antioksidativni, antiapoptotički i antiinflamatorni kapacitet.

Dugoročna insulinska rezistencija određuje početak dijabetesa, upotpunjujući ovaj mehanizam pozitivne povratne informacije. Kada se odnos eHSP70/iHSP70 hronično menja u korist eHSP70, „dugme osetljivosti na insulin“ se isključuje i R vrednosti ((eHSP70)/(iHSP70)) rastu; vežbanje izaziva ekspresiju iHSP70, dok oslobađanje eHSP70 reaguje na suprotan način. R vrednosti između 0 i 1 ukazuju na antiinflamatorni status, a između 1 i 5 na optimalan status imunoinflamatornog nadzora, dok vrednosti R iznad 5 ukazuju na nepoželjan hronični proinflamatorni status.

U našem ogledu je pokazano da visoke vrednosti eHsp70 imaju dodatni nepovoljni efekat na metaboličku adaptaciju lipida i izvedenih parametara kod krava sa visokim vrednostima TNF- α .

Preplitanje puteva, regulatornih mehanizama i efekata TNF- α i eHsp70 u procesima razvoja lipidoze jetre, lipolize, insulinske rezistencije i inflamacije masnog tkiva može biti razlog za nastanak dodatnih nepovoljnih efekata eHsp70, što potvrđuje pro-inflamatorno delovanje ovog čaperona u ekstracelularnoj sredini. U grupi krava gde postoji dodatni efekat eHsp70 (TNF- α +eHsp70 grupa) nađena je koncentracija BHB i NEFA koje su dovoljno visoke da mogu ispoljiti nepovoljni uticaj na sve ostale aspekte metaboličke adaptacije krava (88), što indirektno implicira potencijalni značaj eHsp70 u ukupnoj metaboličkoj adaptaciji krava u ranoj laktaciji.

LITERATURA

1. Zhao H., Raines L.N., Huang S.C.C. *Molecular Chaperones: Molecular Assembly Line Brings Metabolism and Immunity in Shape*. *Metabolites* 2020; 10, 394. <https://doi.org/10.3390/metabo10100394>.
2. Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M. *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. *Nature* 2011; 475, 324–332.
3. Kim Y.E., Hipp M.S., Bracher A., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. *Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis*. *Annu. Rev. Biochem.* 2013; 82, 323–355.
4. Vabulas R.M., Raychaudhuri S., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. *Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response*. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2010; 2, 12: a004390.
5. Fernández-Fernández M.R., Valpuesta J.M. *Hsp70 chaperone: A master player in protein homeostasis*. *F1000Research* 2018; 19.
6. Mahat D.B., Salamanca H.H., Duarte F.M., Danko C.G., Lis J.T. *Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation*. *Mol Cell*. 2016; 62, 63–78. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.025. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27052732; PMCID: PMC4826300.
7. Fujimoto M., Nakai A. *The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress*. *FEBS J.* 2010; 277, 4112–4125.
8. Buzzard K.A., Giaccia A.J., Killender M., Anderson R.L. *Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis*. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 17147–17153.
9. Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S.A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J.M., Garrido C. et al. *Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor*. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3, 839–843.
10. Muralidharan S., Ambade A., Fulham M.A., Deshpande J., Catalano D., Mandrekar P. *Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and hsp70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance*. *J. Immunol.* 2014; 193, 1975–1987.
11. Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad M. *Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases*. *EMBO J.* 1998; 17, 6124–6134.
12. Borges T.J., Wieten L., van Herwijnen M.J., Broere F., van der Zee R., Bonorino C., van Eden W. *The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70*. *Front Immunol.* 2012; 3, 95. doi: 10.3389/fimmu.2012.00095. PMID: 22566973; PMCID: PMC3343630.
13. Kim W.S., Ghassemi Nejad J., Roh S.G., Lee H.G. *Heat-Shock Proteins Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells as an Indicator of Heat Stress in Beef Calves*. *Animals* 2020; 10, 895. <https://doi.org/10.3390/ani10050895>.
14. Dangi S.S., Dangi S.K., Chouhan V.S., Verma M.R., Kumar P., Singh G., Sarkar M. *Modulatory effect of betaine on expression dynamics of HSPs during heat stress acclimation in goat (Capra hircus)*. *Gene* 2016; 575, 543–550.
15. Sheikh A.A., Aggarwal A., Indu B., Aarif O. *Inorganic zinc supplementation modulates heat shock and immune response in heat stressed peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows*. *Theriogenology* 2017; 95, 75–82.
16. Rodrigues-Krause J., Krause C., O'Hagan et al., *Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter?* *Cell Stress and Chaperones* 2012; 17, 3, 293–302.

17. Agnew L.L., Colditz I.G. Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008; 123: 197–204.
18. Asea A. Mechanisms of HSP72 release. *J. Biosci* 2007; 32(3): 579–584.
19. Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14:105–111.
20. Pittet J.F., Lee H., Morabito D., Howard M.B., Welch W.J., Mackersie R.C. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma* 2002; 52: 611–617.
21. Molvarec A., Lilla Tamási, György Losonczy, Krisztina Madách, Zoltán Prohászka, János Rigó Jr. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress and Chaperones* 2010; 15:237–247.
22. Ehres J.A., Meier D.T., Wueest S. et al. Toll-like receptor 2- deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 2010; 53, 8, 1795–1806.
23. Borges T.J., Wieten L., van Herwijnen M.J. et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in Immunology* 2012; 3, 95.
24. Jones Q., Voegeli T.S., Li G., Chen Y., Currie R.W. Heat shock proteins protect against ischemia and inflammation through multiple mechanisms. *Inflammation and Allergy-Drug Targets* 2011; 10, 4, 247–259.
25. Barnes P.J. and Karin M. Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The new England Journal of Medicine* 1997; 336, 15, 1066–1071.
26. Chan J.Y.H., Ou C.C., Wang L.L., Chan S.H.H. Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla. *Circulation* 2004; 110, 23, 3560–3566.
27. Chen H.W., Kuo H.T., Wang S.J., Lu T.S., Yang R.C. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock* 2005; 24, 3, 232–238.
28. Gabai V. L., A. B. Meriin, D. D. Mosser et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases: a novel pathway of cellular thermotolerance. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272, 29, 18033–18037.
29. Beere H.M., B.B. Wolf, K. Cain et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2000; 2, 8, 469–475.
30. Tsuchiya D., S. Hong, Y. Matsumori et al. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures. *Neurosurgery* 2003; 53, 5, 1179–1188.
31. Creagh E.M. and Martin S.J. Cell stress-associated caspase activation: intrinsically complex? *Science's STKE* 2003, 2003; 175, pe11.
32. Zheng Z., Kim J. Y., H. Ma, J. E. Lee, and Yenari M. A. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2008; 28, 1, 53–63.
33. Geiger P.C. and Gupte A.A. Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity," *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2011; 39, 1, 34–42.
34. Gutierrez L.L., A. Maslankiewicz, R. Curi, and P. I. de Bittencourt Jr. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75, 12, 2245–2262.
35. de Bittencourt Jr. P.I.H. and Curi R. Antiproliferative prostaglandins and the MRP/GS X pump role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy," *Biochemical Pharmacology* 2001; 62, 7, 811–819.
36. Rossi A., Kapahi P., Natoli G. et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 2000; 403, 6765, 103–108.
37. Singh I.S., He J.R., S. Calderwood, and Hasday J. D. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277, 7, 4981–4988.
38. Xiao X., X. Zuo, A. A. Davis et al. HSF1 is required for extraembryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO Journal* 1999; 18, 21, 5943–5952.
39. Knowlton A.A. NFkappaB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovascular Research* 2006, 69, 1, 7–8.
40. Dai R., Frejtag W., B. He, Y. Zhang, and Mivechi N. F. c-JunNH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275, 24, 18210–18218.
41. Li H., X. Sun, G. Lesage et al. β -arrestin 2 regulates Tolllike receptor 4-mediated apoptotic signalling through glycogen synthase kinase-3 β . *Immunology* 2010; 130, 4, 556–563.
42. Ghosh S., M. J. May, and Kopp E.B. NF- κ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 1998; 16, 225–260.

43. Asea A., E. Kabingu, M. A. Stevenson, and Calderwood S.K. HSP70 peptidbearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones* 2000; 5, 5, 425–431.
44. Asea A., M. Rehli, E. Kabingu et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277, 17, 15028–15034.
45. Asea A., M. Rehli, E. Kabingu et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, " *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277, 17, 15028–15034.
46. Kim J. J. and Sears D.D. TLR4 and insulin resistance. *Gastroenterology Research and Practice* 2010; 2010, ID 212563, 11 pages.
47. de Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage: it is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress and Chaperones* 2011; 16, 3, 235–249.
48. Campisi J., T. H. Leem, and Fleshner M. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress & Chaperones* 2003; 8, 3, 272–286.
49. Njemini R., C. Demanet, and Mets T. Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein 70 serum concentrations during aging. *Biogerontology* 2004; 5, 1, 31–38.
50. Bautista-Carbajal P., Duarte-Molina P., Contla-Martínez I.I., García-León M.L., Angel-Ambrocio A.H., Baltazar-López N., Wong-Chew R.M. Extracellular heat shock protein 70 is a mortality predictor in patients with septic shock and is associated with the APACHE II and SOFA scores, and the pro-inflammatory immune response. *World Academy of Sciences Journal*, 2021; 3, 1-8.
51. Merchant S., Korbek M. Heat shock protein 70 is acute phase reactant: Response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy. *Cell Stress Chaperones* 2011; 16, 153–162.
52. Gupta A., Cooper Z.A., Tulapurkar M.E., Potla R., Maity T., Hasday J.D., Singh I.S. Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release. *J Biol Chem.* 2013; 288, 2756–2766.
53. Asea A. Chaperokine-induced signal transduction pathways. *Exerc Immunol Rev* 2003; 9, 25-33.
54. Krause M., Heck T.G., Bittencourt A., Scamazzon S.P., Newsholme P., Curi R., Homem de Bittencourt P.I.Jr. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators of inflammation* 2015; 249205. <https://doi.org/10.1155/2015/249205>.
55. 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, 92-97.
56. Catalani E., Amadori M., Vitali A., Bernabucci U., Nardone A., Lacetera N. The Hsp72 response in periparturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters. *Cell Stress & Chaperones* 2010; 15(6): 781-790.
57. 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): 143–149.
58. Molvarec A., Lilla Tamási, György Losonczy, Krisztina Madách, Zoltán Prohászka, János Rigó Jr. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress and Chaperones* 2010; 15:237–247.
59. Molvarec A., Rigó J. Jr., Nagy B., Walentin S., Szalay J., Füst G., Karádi I., Prohászka Z. Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2007; 74:163–169.
60. Wu W.X., Derks J.B., Zhang Q., Nathanielsz P.W. Changes in heat shock protein-90 and -70 messenger ribonucleic acid in uterine tissues of the ewe in relation to parturition and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1996; 137:5685–5693.
61. Chaiworapongsa T., Erez O., Kusanovic J.P., Vaisbuch E., Mazaki-Tovi S., Gotsch F., Than N.G., Mittal P., Kim Y.M., Camacho N., Edwin S., Gomez R., Hassan S.S., Romero R. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21:449–461.
62. 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; 9:143–149.
63. Petrović M., 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 veterinara Srbije, Zlatibor; 2016.
64. Febbraio M.A., Mesa J.L., Chung J., Steensberg A., Keller C., Nielsen H.B., Krstrup P., Ott P., Secher N.H., Pedersen B.K. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9:390–396.

65. 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 signalling. *PLoS ONE* 2008; 3:e4068.
66. Catalani E., Amadori M., Vitali A., Bernabucci U., Nardone A., Lacetera N. The Hsp72 response in periparturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters. *Cell Stress and Chaperones* 2010; DOI 10.1007/s12192-010-0186-x.
67. Chung J., Nguyen A.K., D.C.Henstridge et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105, 5, 1739–1744.
68. Kurucz I., A. Morva, A. Vaag et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 2002; 51, 4, 1102–1109.
69. Atalay M., N. K. J. Oksala, D. E. Laaksonen et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *Journal of Applied Physiology* 2004; 97, 2, 605–611.
70. Newsholme P. and P. I. H. de Bittencourt Jr. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2014; 17, 4, 295–305.
71. Rodrigues Krause J., M. Krause, C. O'Hagan et al. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress and Chaperones* 2012; 17, 3, 293–302.
72. de Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage: it is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress and Chaperones* 2011; 16, 3, 235–249.
73. Campisi J., T. H. Leem, and Fleshner M. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress & Chaperones* 2003; 8, 3, 272–286.
74. Cincović M.R. *Metabolički stres krava, Monografija, Poljoprivredni fakultet-Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, 2016.*
75. McFadden J. Review: Lipid biology in the periparturient dairy cow: Contemporary perspectives. *Animal*, 2020; 14(S1), S165-S175. doi:10.1017/S1751731119003185.
76. Cincović M., Kirovski D., Vujanac I., Belić B., Djoković R. Relationship between the indexes of insulin resistance and metabolic status in dairy cows during early lactation. *Acta Veterinaria* 2017; 67, 57-70.
77. Sordillo L.M., Raphael W. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Vet Clin Food Anim* 2013; 29, 267–278.
78. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H., Kawamura S. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J. Vet. Med. Sci.* 2001; 63, 1021-1025.
79. Contreras G.A. and Sordillo L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 34, 281-289.
80. Sordillo M.L., Contrera G.A., Aitken S.L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev* 2009; 10, 53–63.
81. Catalani E., Amadori M., Vitali A., Bernabucci U., Nardone A., Lacetera N. The Hsp72 response in periparturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters. *Cell Stress and Chaperones* 2010; 15, 781–790. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0186-x>.
82. Lamy E., Jurkovich V., Rodrigues L., Geraldo A., Cachucho L., Silva F., Matos C., Capelae Silva F., Pinheiro C., Könyves L., Bakony M., Pereira A. Detection of 70 kDa heat shock protein in the saliva of dairy cows. *J Dairy Res* 2017; 84, 280-282.
83. 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, 143–149. doi:10.1379/CSC-17.1.
84. Archer A.E., Rogers R.S., Von Schulze A.T., Wheatley J.L., Morris E.M., McCoin C.S., Thyfault J.P., Geiger P.C. Heat shock protein 72 regulates hepatic lipid accumulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2018; 315(4), R696-R707.
85. Shi H., Yao R., Lian S., Liu P., Liu Y., Yang Y.Y., Yang H., Li S. Regulating glycolysis, the TLR4 signal pathway and expression of RBM3 in mouse liver in response to acute cold exposure. *Stress* 2019; 22, 366–376.
86. Grabner G.F., Xie H., Schweiger M., Zechner, R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nature Metabolism* 2021; 3, 11, 1445-1465.
87. Alfaro I.E., Albornoz A., Molina A., Moreno J., Cordero K., Criollo A., Budini, M. Chaperone mediated autophagy in the crosstalk of neurodegenerative diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 9, 778.
88. Cincović, R. M., Belić, B., Radojičić, B., Hristov, S., Đoković, R. Influence of lipolysis and ketogenesis to metabolic and hematological parameters in dairy cows during periparturient period. *Acta veterinaria* 2012; 62, 429-444.