

**SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO**



# **ZBORNİK RADOVA I KRATKIH SADRŽAJA**

**32. SAVETOVANJE VETERINARA SRBIJE**



Zlatibor, 9–12. septembar 2021.

**32. SAVETOVANJE VETERINARA SRBIJE**  
**Zlatibor, 09–12. septembar, 2021.**

**Organizator:**

Srpsko veterinarsko društvo

**Suorganizatori:**

Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Departman za veterinarsku medicinu

**Pokrovitelji:**

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu  
Veterinarska komora Srbije

**Predsednik SVD:** Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

**Organizacioni odbor:**

**Predsednik:** Milorad Mirilović

**Potpredsednici:** Stamen Radulović i Miodrag Rajković

**Sekretar:** Jasna Stevanović

**Tehnički sekretar:** Katarina Vulović

**Marketing menadžer:** Nebojša Aleksić

**Programski odbor:**

Nedeljko Karabasil (predsednik), Danijela Kirovski, Sonja Radojičić, Sanja Aleksić Kovačević, Bojan Toholj,  
Slobodanka Vakanjac, Ivan Vujanac, Vitomir Čupić, Dragan Šefer, Milan Maletić, Vladimir Dimitrijević

**Počasni odbor:**

Branislav Nedimović, Emina Milakara, Nedeljko Tica, Ivan Bošnjak, Ivan Stančić, Mišo Kolarević,  
Saša Bošković, Nenad Budimović, Ratko Ralević

**Sekretarijat:**

Slobodan Stanojević, Sava Lazić, Ivan Miloš, Miodrag Bošković, Radislava Teodorović, Milutin Simović,  
Zoran Rašić, Milan Đorđević, Predrag Maslovarić, Zoran Jevtić, Zoran Knežević, Vojislav Arsenijević,  
Ljubinko Šterić, Dragutin Smoljanović, Miloš Petrović, Bojan Blond, Vesna Đorđević, Dobrila Jakić-Dimić,  
Branislava Belić, Slavica Kuša Jelesijević, Milica Lazić, Laslo Matković, Darko Bošnjak, Petar Milović,  
Rade Došenović, Nikola Milutinović, Gordana Žugić, Jasna Stevanović, Željko Sladojević

**Izdavač:**

Srpsko veterinarsko društvo, Beograd

**Za izdavača:**

Prof. dr Milorad Mirilović, predsednik SVD

**Urednici:**

Prof. dr Miodrag Lazarević i prof. dr Nedeljko Karabasil

**Lektura i korektura:** Prof. dr Lazarević Miodrag

**Tehnički urednik:** Lazarević Gordana

**Tehnička izrada korica:** Branislav Vejnović

**Štampa:** Naučna KMD, Beograd, 2021

**Tiraž:** 400 primeraka

**ISBN** 978-86-83115-43-3

## SADRŽAJ

- ◆ **Milanko Šekler, Dejan Vidanović, Bojana Tešović, Kazimir Matović, Nikola Vasković, Aleksandar Žarković, Zoran Debeljak, Marko Dmitrić, Tamaš Petrović, Sava Lazić:**  
Uloga i značaj veterinarske službe u uslovima aktuelne pandemije ..... 1
- ◆ **Zoran Rašić, Milorad Mirilović, Dragiša Trailović, Radmila Marković:**  
Akademija veterinarske medicine Srpskog veterinarskog društva – čast  
i ponos veterinarske profesije ..... 31

### TEMATSKO ZASEDANJE I

#### AKTUELNA EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA

- ◆ **Boban Đurić, Tatjana Labus, Jelica Uzelac, Saša Ostojić, Aleksandra Nikolić, Jelena Ćuk:**  
Epizootiološka situacija u Srbiji 2020. godine ..... 35
- ◆ **Mišo Kolarević, Miodrag Rajković, Miloš Petrović, Zoran Raičević, Siniša Grubač, Slobodan Stanojević, Radomir Došenović, Boban Đurić, Saša Ostojić, Irena Milosavljević, Zoran Sporić:**  
Saniranje žarišta AKS na farmi svinja i značaj biosigurnosnih mera u kontroli bolesti ..... 36
- ◆ **Milijana Nešković, Bojan Ristić, Rade Došenović, Branislav Aleksić, Zoran Debeljak, Jasna Prodanov Radulović:**  
Epizootiološka situacija afričke kuge svinja u Zaječarskom i Borskom okrugu ..... 44
- ◆ **Zoran Debeljak, Aleksandar Tomić, Nikola Vasković, Dejan Vidanović, Kazimir Matović, Aleksandar Žarković, Milanko Šekler, Marko Dmitrić, Slavica Jovanović, Danijela Šaponjić:**  
Epizootiološka situacija, karakteristike i mere kontrole afričke kuge svinja u Rasinskom okrugu ..... 46
- ◆ **Milena Živojinović, Slavonka Stokić Nikolić, Ivan Dobrosavljević, Milica Lazić, Oliver Savić, Jovan Popović, Sonja Paunović:**  
AKS u populaciji divljih svinja u Braničevskom okrugu ..... 61
- ◆ **Miroljub Dačić, Igor Đorđević, Zoran Rašić, Katarina Anđelković, Dušan Simonović, Jelena Petković:**  
Epizootiološka situacija, pojava i suzbijanje AKS u Pomoravskom okrugu ..... 62
- ◆ **Saša Ostojić:**  
Aktivnosti nacionalnog kriznog štaba u suzbijanju AKS ..... 63
- ◆ **Spomenka Đurić, Branislav Vejnović, Jelena Janjić, Radislava Teodorović, Aleksandra Nikolić, Drago Nedić, Milorad Mirilović:**  
"Cost-benefit" analiza pri pojavi bolesti plavog jezika kod domaćih preživara u Republici Srbiji ..... 64
- ◆ **Dragana Dimitrijević, Verica Jovanović, Dejan Ivanović, Marija Milić:**  
Epidemiološka situacija zoonoza u Srbiji tokom pandemije COVID 19 i granični prelazi ..... 73
- ◆ **Mihajlo Erdeljan, Tijana Kukurić, Ivana Davidov, Miodrag Radinović:**  
Aktuelna epidemiološka situacija virusa Zapadnog Nila u Evropi ..... 74

### TEMATSKO ZASEDANJE II

#### REPRODUKCIJA I ZDRAVSTVENA ZAŠTITA FARMSKIH ŽIVOTINJA

- ◆ **Milan Maletić, Miloš Pavlović, Vladimir Magaš, Miloje Đurić, Ljubodrag Stanišić, Slobodanka Vakanjac, Jovan Blagojević:**  
Reproduktivni poremećaji kod krava prouzrokovani promenama na jajnicima – da li je baš uvek kao što izgleda? ..... 83
- ◆ **Jelena Apić, Ivan Galić, Ivan Stančić, Tomislav Barna, Slobodanka Vakanjac, Aleksandar Milovanović:**  
Proteini spermalne plazme nerastova kao genetski markeri kvaliteta semena ..... 92

◆ Ivan Vujanac, Radiša Prodanović, Jovan Bojkovski, Sreten Nedić, Sveta Arsić, Slavica Dražić, Milica Stojić, Danijela Kirovski: Proteini toplotnog stresa kao potencijalni biomarkeri tolerancije na toplotni stres kod visokomlečnih krava .....	104
◆ Božidar Savić, Nemanja Zdravković, Oliver Radanović, Nemanja Jezdimirović, Branislav Kureljušić, Bojan Milovanović, Ognjen Stevančević: Klinička slika, patomorfološke promene i mikrobiološke karakteristike izolata <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>Enterica</i> serovar choleraesuis infekcije kod zalučene prasadi .....	111
◆ Saša Ivanović, Vitomir Čupić, Sunčica Borozan, Silva Dobrić, Dejana Čupić-Miladinović, Mila Savić, Žolt Bečkei, Nevena Borozan: Primena doksiciklina kod farmskih životinja .....	113
◆ Zorana Kovačević, Miodrag Radinović, Dragana Tomanić, Jovan Stanojević, Nebojša Kladar, Biljana Božin: Antibiotska rezistencija najčešćih uzročnika mastitisa krava .....	125
◆ Nemanja Zdravković, Milan Ninković, Oliver Radanović, Božidar Savić, Đorđe S. Marjanović, Radoslava Savić Radovanović: Nalaz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kod zapaljenja pluća prasadi .....	133
◆ Marko Pajić, Slobodan Knežević, Dalibor Todorović, Biljana Đurđević, Milena Samojlović, Miloš Pelić, Suzana Vidaković Knežević, Dušan Lazić, Zdravko Tomić: Pojava infektivnog laringotraheitisa u jatima koka nosilja na području Vojvodine .....	138
◆ Teodora Vasiljević, Oliver Stanković, Milka Đermanov, Bojan Vujić, Ivan Marković, Žarko Avramov: Ponašanje i dobrobit svinja u farmskim uslovima držanja .....	139
◆ Nenad Popov, Željko Mihaljev, Milica Živkov Baloš, Sandra Jakšić, Sava Lazić, Dubravka Milanov, Gospava Lazić, Marko Pajić: Kvalitet vode kao faktor biosigurnosti na farmama svinja .....	145
◆ Jovan Stanojević, Miodrag Radinović, Marko R. Cincović, Branislava Belić, Zorana Kovačević, Tijana Kukurić: Uticaj mastitisa na hemijski sastav mleka kod krava .....	146
◆ Srđan Todorović, Marko R. Cincović, Zoran Ružić, Zdenko Kanački, Ivan Galić, Ivica Jožef, Mirko Dražić: Konzentracija progesterona u krvi i pojava endometritisa kod krava sa zaostalom posteljicom .....	152

### TEMATSKO ZASEDANJE III

#### NUTRITIVNA PREVENCIJA I TERAPIJA METABOLIČKIH POREMEĆAJA ŽIVOTINJA U INTENZIVNOJ STOČARSKOJ PROIZVODNJI

◆ Dragan Šefer, Dejan Perić, Stamen Radulović, Svetlana Grdović, Lazar Makivić, Dragoljub Jovanović, Radmila Marković: Zasušenje – nutritivni izazov u prevenciji metaboličkih bolesti kod preživara .....	159
◆ Radmila Marković, Stamen Radulović, Dejan Perić, Dragan Šefer: Značaj optimalnog obezbeđivanja kalcijuma i fosfora u hrani za životinje .....	167
◆ Radulović Stamen, Jokić Živan, Šefer Dragan, Marković Radmila, Perić Dejan, Rašić Zoran, Kojičić-Stefanović Jasmina: Značaj i uloga ishrane u nastanku i prevenciji sindroma iznenadne smrti brojlera .....	177
◆ Dejan Perić, Radmila Marković, Stamen Radulović, Svetlana Grdović, Dragoljub Jovanović, Dragan Šefer: Nutritivne strategije u prevenciji i terapiji anemije usled deficita gvožđa kod prasadi .....	192

◆ <b>Marcela Šperanda, Veronika Halas, Melinda Kovacs, Zdenko Lončarić, Jakov Jurčević, Tomislav Šperanda, Mislav Đidara, Dalibor Đud:</b> Biofortifikacija i drugi tehnološki postupci obogaćivanja hrane za životinje .....	204
◆ <b>Jelena Janjić, Branislav Baltić, Milorad Mirilović, Drago Nedić, Spomenka Đurić, Branislav Vejnović, Radmila Marković:</b> Uticaj dodavanja srednjelančanih masnih kiselina na ekonomsku efikasnost ishrane brojlera .....	213
◆ <b>Zoran Ružić, Zdenko Kanački, Srđan Todorović, Dušan Lazić, Slobodan Knežević, Suzana Vidaković Knežević:</b> Rano termalno kondicioniranje dovodi do kompezatornog rasta i bolje konverzije hrane kod tovnih pilića u uslovima toplotnog stresa .....	222

## TEMATSKO ZASEDANJE IV

### GAJENJE, PATOLOGIJA I ZDRAVSTVENA ZAŠTITA RIBA

◆ <b>Zoran Marković, Marko Stanković, Božidar Rašković, Ivana Živić, Vladimir Radosavljević:</b> Diverzifikacija na ribnjacima – kao alternativa intenziviranju proizvodnje u težnji ostvarivanja većeg prihoda uz manji rizik od bolesti riba .....	227
◆ <b>Vladimir Radosavljević, Dimitrije Glišić, Vesna Milićević, Tatjana Labus, Oliver Radanović, Nemanja Zdravković, Zoran Marković:</b> Sistem zdravstvene kontrole riba i najznačajnije bolesti u akvakulturi Srbije .....	228
◆ <b>Ksenija Aksentijević, Maja Marković:</b> Održavanje zdravlja riba u akvakulturi: epidemiološki pristup prevenciji i kontroli infektivnih bolesti .....	234
◆ <b>Vitomir Čupić, Saša Ivanović, Sunčica Borozan, Andreja Prevendar Crnić, Indira Mujezinović, Gordana Žugić, Romel Vele, Dejana Čupić Miladinović:</b> Primena antimikrobnih lekova kod riba .....	245
◆ <b>Ksenija Aksentijević:</b> Pojava antimikrobne rezistencije u akvakulturi – šta do sada znamo i koji su sledeći koraci? .....	258
◆ <b>Vitomir Čupić, Saša Ivanović, Sunčica Borozan, Andreja Prevendar Crni, Indira Mujezinović, Gordana Žugić, Romel Vele, Dejana Čupić Miladinović:</b> Pesticidi toksični za ribe .....	264
◆ <b>Nikolina Novakov, Brankica Kartalović, Željko Mihaljev, Dušan Lazić, Branislava Belić, Dragan Rogan:</b> Koncentracije teških metala i policikličnih aromatičnih ugljovodonika u dagnjama sa tržišta Srbije .....	275
◆ <b>Sandra Nikolić, Nikolina Novakov, Aleksandar Potkonjak:</b> Određivanje pola kod jesetarskih riba primenom ultrazvuka .....	276
◆ <b>Dušan Lazić, Miloš Pelić, Slobodan Knežević, Marko Pajić, Zoran Ružić, Tijana Kukurić, Nikolina Novakov:</b> Upotreba aparata za elektroribolov u svrhe uzorkovanja riba .....	277

## TEMATSKO ZASEDANJE V

### ZDRAVSTVENA ZAŠTITA I REPRODUKCIJA KUĆNIH LJUBIMACA

◆ <b>Plamen Trojačanec, Blagica Sekovska:</b> Komunikacija sa klijentima u maloj praksi: strategije rešavanja problema u zahtevnim situacijama .....	281
◆ <b>Kreszinger Mario, Pačin Marko:</b> Vijci i ploče kao implantanti za osteosintezu .....	292

◆ <b>Natalija Milčić Matić:</b> Kušingov sindrom: onkološko ili endokrino oboljenje? .....	303
◆ <b>Ivan Stančić i Ivan Galić:</b> Poremećaji reprodukcije mužjaka pasa – problemi veterinara i odgajivača.....	309
◆ <b>Ozren Smolec, Ivo Kokalj, Tomislav Bosanac, Bojan Toholj:</b> Abdominalni kompartment sindrom u pasa .....	314
◆ <b>Marko Pečin:</b> Nova osteoinduktivna metoda liječenja defekta humerusa u pasa nakon nastrijela upotrebom RHBMP6 u autolognom koagulumu sa keramikom .....	315

## TEMATSKO ZASEDANJE VI

### ODRŽIVI UZGOJ, OČUVANJE I PROIZVODI SA DODATOM VREDNOŠĆU AUTOHTONIH RASA DOMAĆIH ŽIVOTINJA I SLOBODNE TEME

◆ <b>Elmin Tarić, Besckei Zsolt, Ružica Trailović, Mila Savić, Vladimir Dimitrijević:</b> Značaj animalnih proizvoda sa dodatom vrednošću za opstanak i promociju ugroženih animalnih genetičkih resursa – sjenička ovca .....	319
◆ <b>Ružica Trailović, Mila Savić, Vladimir Dimitrijević:</b> Očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja kroz održivu proizvodnju i zaštitu ambijenta .....	320
◆ <b>Katarina Nenadović, Ljiljana Janković, Vladimir Dimitrijević, Marijana Vučinić:</b> Dobrobit životinja u ekstenzivnim uslovima proizvodnje .....	321
◆ <b>Radoslava Savić Radovanović, Mladen Mihajlović, Saša Bošković, Drago Nedić, Dragan Vasilev:</b> Stanje i perspektive u organskoj proizvodnji Republike Srpske .....	332
◆ <b>Antonija Rajčić, Milan Ž. Baltić, Ivana Branković Lazić, Branislav Baltić, Marija Starčević, Slađan Nešić:</b> Patohistološke karakteristike drvenastih grudi i kvalitet mesa brojlera .....	333
◆ <b>Milan Ž. Baltić, Saša Bošković, Ivana Branković Lazić, Branislav Baltić, Antonija Rajčić, Jelena Janjić, Marija Starčević:</b> Kulinarski i industrijski postupci omeškavanja mesa .....	339
◆ <b>Svetlana Grdović, Stamen Radulović, Dejan Perić, Radmila Marković Dragan Šefer:</b> Prilog sagledavanju potencijala livada i pašnjaka Stare planine za uzgoj autohtonih rasa životinja .....	347
◆ <b>Vitomir Čupić, Saša Ivanović, Sunčica Borozan, Dobrić Silva, Andreja Prevendar Crnić, Indira Mujezinović, Gordana Žugić, Romel Vele, Dejana Čupić Miladinović:</b> Neracionalna primena antimikrobnih lekova u veterinarskoj medicini kao mogući uzrok štetnih efekata na životnu sredinu .....	348
◆ <b>Tijana Kukurić, Mihajlo Erdeljan, Dušan Lazić, Ivan Galić, Jovan Stanojević:</b> Detekcija srčanih šumova kod konja .....	359
◆ <b>Slobodan Knežević, Marko Pajić, Suzana Vidaković Knežević, Dušan Lazić, Biljana Đurđević, Zoran Ružić, Zdenko Kanački, Vladimir Polaček, Milutin Đorđević:</b> Uticaj različitih vrsta prostirke na emisiju štetnih gasova u brojlerskoj proizvodnji .....	363
◆ <b>Suzana Vidaković Knežević, Sunčica Kocić-Tanackov, Snežana Kravić, Slobodan Knežević, Jelena Vranešević, Marko Pajić, Zoran Ružić, Jasna Kureljušić, Neđeljko Karabasil:</b> Antimikrobna aktivnost <i>Lamiaceae</i> etarskih ulja protiv <i>Salmonella enteritidis</i> izolovanih iz mesa živine .....	364

## PROTEINI TOPLOTNOG STRESA KAO POTENCIJALNI BIOMARKERI TOLERANCIJE NA TOPLOTNI STRES KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

*Ivan Vujanac, Radiša Prodanović, Jovan Bojkovski, Sreten Nedić, Sveta Arsić, Slavica Dražić, Milica Stojić, Danijela Kirovski*

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, R. Srbija

### **Kratak sadržaj**

Cilj ovog preglednog rada je da se prikaže značaj poznavanja mehanizama koji leže u osnovi toplotnog stresa kod visokomlečnih krava, kao i da se opišu metode koje su najčešće u upotrebi pri određivanju pojedinih bioloških markera toplotnog stresa. Povišena spoljašnja temperatura tokom letnjih meseci često uvodi krave u stanje toplotnog stresa, sa posledičnim smanjenjem reproduktivnih i proizvodnih sposobnosti jedinki koje mogu dovesti do njihovog prevremenog izlučivanja iz zapata. Kao potencijalni biomarkeri toplotnog stresa, poslednjih godina se sve više pominju proteini toplotnog stresa (engl. Heat Stress Proteins - HSP), čija se molekulska masa kreće od 15 do 110 kDa, a koji su prisutni u citosolu, jedru, mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu. Na osnovu molekulske težine i funkcije, HSP su podeljeni na: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 i HSP10, pri čemu su, kod farmskih životinja, HSP90 i HSP70 odgovorni za toleranciju na visoke temperature. Protein toplotnog stresa HSP70 je najčešće ispitivani protein kod krava i najosetljiviji na promene spoljašnje temperature u zoni toplotnog stresa. Proteini toplotnog stresa se mogu određivati iz različitih bioloških materijala, kao što su: krv, krvni serum, parenhimatozni organi (bubrezi, slezina, jetra), srce, limfni čvorovi, mišićno i masno tkivo, sperma, pljuvačka i folikuli dlake. U skladu sa dobrobiti, a u cilju što manjeg uznemiravanja životinja tokom uzorkovanja bioloških materijala, sve se više daje prednost onim uzorcima koji se dobijaju neinvazivnim putem, a to su pre svega folikuli dlake, mleko, pljuvačka i sperma. Dve najčešće metode koje su u primeni za analizu proteina toplotnog stresa su ELISA metoda kojom se određuje zastupljenost proteina u uzorku i PCR metoda kojom se utvrđuje ekspresija odgovarajućih gena. Ekspresija gena se može odrediti izolacijom i amplifikacijom DNK, kao i ekstrakcijom ukupne RNK korišćenjem specifičnih prajmera i sekvenci aminokiselina. U zaključku, ispitivanje bioloških mehanizama koji leže u osnovi toplotnog stresa, kao i metode koje se mogu koristiti za njihovo određivanje, može biti od velike koristi za uspostavljanje protokola na farmama visokomlečnih krava kojima bi se pravovremeno zaštitile životinje od visokih temperatura tokom letnjeg perioda ali i za detekciju jedinki koje imaju bolji genetski potencijal u pogledu tolerancije na toplotni stres.

**Ključne reči:** biomarkeri, ELISA, HSP70, PCR, proteini toplotnog stresa

## UVOD

Globalno zagrevanje, zabeleženo proteklih godina dovodi do značajnog porasta ambijentalne temperature, pogotovo tokom letnjih meseci kada su temperature visoke, u prostoru gde najčešće borave životinje gajene u intenzivnom uzgoju. Taj porast ambijentalne temperature često uvodi životinju u stanje toplotnog stresa. Kao pokazatelji toplotnog stresa se najčešće navode vlažnost vazduha i spoljašnja temperatura, odnosno njihova kombinacija. Na osnovu ova dva parametra izračunavase THI (engl. *temperature-humidity index*). Vrednost THI manja od 72 ukazuje na nivo toplotnog stresa koji je povoljan na organizam krava, dok dobijena vrednost od 72-78 ukazuje da je jedinka izložena umerenom toplotnom stresu. Kada je vrednost THI iznad 78, životinja je izložena izrazitom toplotnom stresu (Vujanac i sar., 2010). Izrazit toplotni stres izazvan visokim temperaturnom često ima negativan uticaj na proizvodno reproduktivne sposobnosti, ali i zdravlje visokomlečnih krava i time može dovesti do značajnih ekonomskih gubitaka u govedarskoj proizvodnji. Ekonomski gubici u govedarstvu, koji nastaju kao posledica delovanja toplotnog stresa, mogu se objasniti smanjenjem produkcije mleka, poremećajem reproduktivnih parametara i povećanjem mortaliteta. Prosečni ekonomski gubici govedarske proizvodnje, na godišnjem nivou u SAD, mogu da iznose i 369 miliona dolara (Pierre i sar., 2003).

U cilju smanjenja ovih gubitaka, veliki značaj se pridaje otkrivanju fizioloških mehanizama koji leže u osnovi toplotnog stresa, ali i pronalaženju onih biomarkera koji će identifikovati životinje koje imaju veću toleranciju na toplotni stres. Kao potencijalni biomarkeri toplotnog stresa sve češće se pominju proteini toplotnog stresa (engl. *Heat Stress Proteins-HSP*).

Proteini toplotnog stresa (HSP) su grupa proteina čija se ekspresija povećava u ćeliji kao odgovor na različite vrste stresa. Pretpostavlja se da ovi proteini stabilizuju osnovne ćelijske procese i da imaju zaštitnu ulogu u obnavljanju oštećenja izazvanih stresom (Mayer i Bukau, 1998). Takođe, oni imaju veliki značaj u kontroli ćelijskog ciklusa (Jolly i Morimoto, 2000), transdukciji mitogenih signala (Helmbrecht, 1999), diferencijaciji i razviću (Galea-Lauri, 1996). Oni stabilizuju osnovne strukturne proteine, pomažu transfer proteina kroz membranu, pomažu ponovno savijanje i zauzimanje ispravne konformacije denaturisanih proteina i pomažu degradaciju aberantnih proteina. Često se nazivaju i molekularni šaperoni, zbog toga što omogućuju promenu trodimenzionalne strukture drugih molekula (Hendrick i Hartl, 1993).

Poznate su mnoge funkcionalne uloge HSP, ali mehanizmi koji leže u osnovi tih uloga još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Pretpostavlja se da bi razumevanje ovih mehanizama omogućilo da se izvrši preciznija analiza načina na koje se ćelije bore protiv stresa kod raznih oboljenja (npr. imunskih bolesti, tumora, kardiovaskularnih bolesti, starenja i slično) (Hall i sar., 2000; Moseley i sar., 2000; Garrido i sar., 2001).

Određivanje koncentracije HSP može poslužiti za utvrđivanje stepena ćelijskih oštećenja kao i u dijagnostičke i terapijske svrhe.



## Familije proteina toplotnog stresa

Proteine toplotnog stresa proizvode prokariotske i eukariotske ćelije kao odgovor na izloženost stresnim uslovima. Italijanski genetičar Ferruccio Ritossa je 1962. godine utvrdio da toplota i metaboličke promene dovode do promena u hromozomu kod *Drosophila*, što je bilo prvo otkriće koje je uslovalo niz kasnijih studija koje su konačno dovele do identifikacije proteina toplotnog stresa (Maioisar, 2012). Koncentracija mnogih HSP je povećana tokom različitih stresnih situacija (Bao i sar., 2008; Zhang i sar., 2011).

HSP su podeljeni u šest familija: mali proteini toplotnog stresa - sHSP 27 (engl. *small heat stress protein* 27), HSP 40, HSP 60, HSP 70, HSP 90 i HSP 100. Podeljeni su na osnovu njihove monomerne molekulske težine i mogu se naći i u prokariotskim i u eukariotskim organizmima (van Eden, van der Zee i Prakken, 2005). Osnovni HSP imaju molekulska masu u rasponu od 15 do 110 kDa i podeljeni su u grupe na osnovu veličine, ali i funkcije (Schlesinger 1990, Welch 1992), a prisutni su u citosolu, mitohondrijama, endoplazmatskom retikulumu i jedru. Za HSP 27, HSP 70 i HSP 90 je utvrđeno da se značajno povećavaju tokom transportnog stresa kod pilića i svinja, i smatra se da su povezani sa zaštitnim funkcijama organizma tokom transporta (Al-Akil i Zulkifli, 2009; Zhang i sar., 2011). Spoljašnja temperatura koja odgovara većini farmskih životinja se kreće u opsegu od 4 do 25 °C, dok temperatura koja prelazi 25 °C može da dovede do toplotnog stresa (Archana i sar., 2017). Najviše radova ima o HSP sisara sa molekularnom masom 60, 70, 90 i 110 kDa u uslovima toplotnog stresa. U tabeli 1 je dat prikaz lokalizacije u ćeliji i funkcije najznačajnijih HSP.

**Tabela 1.** Podela, lokalizacija i uloga HSP (modifikovano po Kregel-u, 2002)

HSP familija	Lokalizacija u ćeliji	Funkcija
HSP27 (sHSP)	Citosol, jedro	Stabilizacija mikrofilamenta, antiapoptično delovanje
HSP60	Mitohondrije	Prevenција, agregacije i denaturacije proteina, proapoptično delovanje
HSP72 (Hsp70)	Citosol, jedro	Zaštita ćelija, čuvanje proteina
HSP73 (Hsc70)	Citosol, jedro	Molekularni šaperoni
HSP75 (mHSP70)	Mitohondrije	Molekularni šaperoni
HSP78 (GRP78)	Eritrociti	Zaštita ćelija, molekularni šaperoni
HSP90	Citosol, jedro, eritrociti	Regulacija receptora steroidnih hormona, translokacija proteina
HSP110/104	Citosol	Čuvanje proteina

Mali proteini toplotnog stresa (sHSP27, HSPB7,  $\alpha$ B-crystallin, HSP20 i P26) su familija molekularnih šaperona (Yang i sar., 2011), koji održavaju fi-

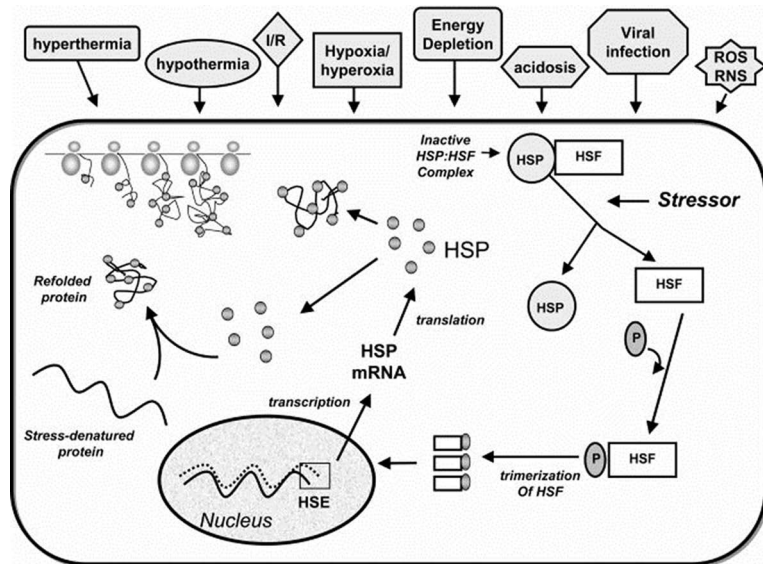
ziološke metaboličke procese u ćeliji, ali imaju i zaštitnu ulogu u ćeliji tokom njene izloženosti toplotnom stresu (Verschuure i sar., 2003). Protein toplotnog stresa B7 (HSP B7), je član male familije proteina i najčešće je ispitivan u kardiovaskularnom sistemu, skeletnim mišićima i masnom tkivu (Yang i sar., 2011). Jedan od prvih proteina toplotnog stresa koji je povezan sa usporenim metabolizmom je bio P26, mali protein, koji se akumulira u velikoj količini usled dejstva štetnih faktora (MacRae, 2003). Iako poseduje šaperonsku aktivnost, P26 migrira u jedro prilikom toplotnog stresa ili anoksije i smatra se da ima veoma važnu ulogu u represiji transkripcije (Tsvetkova, 2002).

Najosetljiviji na promenu temperature su proteini toplotnog stresa, HSP70. Proteini ove grupe dele zajedničke proteinske sekvence, ali se sintetišu kao odgovor na različite stimuluse. Na primer, protein od 73 kDa (HSP 73 ili Hsc70) se stalno proizvodi dok je protein od 72 kDa (HSP 72 ili Hsp 70) visoko inducibilan i njegova sinteza se povećava kao odgovor na više stresora (Schlesinger 1990; Welch, 1992; Hightower LE i Hendershot, 1997; Moseley, 2000). Nivo HSP70 u ćelijama je u pozitivnoj korelaciji sa tolerancijom na širok spektar stresora koje se nalaze u životnoj sredini, kao što su: toplotni stres, prisustvo teških metala (Wagner i sar., 1999), osmotski stres (Kurz i sar., 1998), kao i fiziološki stresovi: ishemija i oksidativni stres (Kumar i Tatu, 2000). Kao odgovor na toplotni stres i stres u okruženju (Mohanarao i sar., 2014), HSP 70 je smatran idealnim biološkim markerom za merenje toplotnog stresa kod životinja (Srikanth i sar., 2017). Polimorfizam gena HSP 70 objašnjava individualne razlike u toleranciji stresnih uslova, poput toplotnog stresa, polimorfizma izazvanog genetskim mutacijama, što može biti iskorišćeno kao mera za otpornost organizma prema toplotnom stresu (Cai i sar., 2005). U radovima se HSP90 češće koristi kao marker transportnog stresa, a ređe zbog svoje manje osetljivosti u ispitivanju toplotnog stresa (Hu i sar., 2020). Protein toplotnog stresa od 90 kDa (HSP90), koji postoji u relativno visokim koncentracijama u ćelijama u fiziološkim uslovima (Lindquist i sar., 1988) i tokom evolucije nije promenjen (Moore i sar., 1989), je jedan od mogućih biomarkera toplotnog stresa. Uloga HSP90 je u ćelijskom rastu i diferencijaciji (Lindquist i sar. 1988) i on svoju funkciju obavlja putem regulacije kazein kinaze II ili putem regulacije receptora steroidnih hormona (Catelli i sar., 1985).

### **Mehanizam delovanja proteina toplotnog stresa**

Izloženost ćelije toplotnom stresu izaziva brojne anomalije u njenim funkcijama koje menjaju biološke molekule, ometaju ćelijske funkcije, moduliraju metaboličke reakcije, izazivaju oksidativno oštećenje ćelija i aktiviraju puteve apoptoze i nekroze, što na kraju dovodi do preživljavanja ćelije, aklimatizacije ili ćelijske smrti (Belhadj i sar., 2016). Odgovor ćelije na toplotni stres kod sisara se kontroliše na nivou transkripcije i posredovan je porodicom transkripcionih faktora toplotnog stresa (HSF) koji su regulisani indukovanom ekspresijom HDF gena. Ključni signal za aktivaciju i indukciju "heat stress" gena je prisustvo oštećenih proteina (slika 1) i proteinskih agregata u ćeliji (Morimoto i Santoro, 1998).

Kao pratioci proteina “molecular chaperones”, HSP sprečavaju nepravilno savijanje (“*folding*”) i agregaciju nosintetisanih proteina i omogućavaju ispravno savijanje, formiranje funkcionalnih trodimenzionalnih struktura proteina i oligomerizaciju polipeptida (Buchner, 1999).



**Slika 1.** Fiziološka signalizacija koja aktivira ekspresiju HSP 70 (preuzeto od Kregel i sar., 2002)

Takođe, HSP štite proteine od denaturacije ili, ako je do nje već došlo, omogućavaju dezagregaciju, odvijanje i ponovo savijanje (“*refolding*”) u biološki aktivan oblik (Morimoto i Santoro, 1998). Oni su uključeni u brojne vitalne procese i veoma suptilne regulatorne mehanizme kao što su: kontrola formiranja stabilnih struktura nativnih proteina (Freeman i Morimoto, 1996), reaktivacija oštećenih proteina (Parsell i Lindquist, 1993) ili proteolitička degradacija i eliminacija denaturisanih i nefunkcionalnih proteina (Ellis i Hartl, 1999). Mnogi tipovi šaperona su konstitutivno prisutni u ćeliji, ali je velik i broj onih koji se povećavaju u uslovima stresa (Goldberg, 2003). Zajednički odgovor na mnoge vrste stresa je supresija sinteze proteina i aktivacija proteina toplotnog stresa. Povišen nivo šaperona u stanju usporenog metabolizma može da obezbedi dužu stabilnost i životni vek ćelijskih proteina koji bi normalno bili zamenjeni, ali tokom usporenog metabolizma za koje je karakteristična ušteda energije to nije moguće (Lindquist, 1988). Zajednički odgovor na mnoge vrste stresa je povećana sinteza i aktivnost HSP koji imaju za cilj da “poprave” oštećene proteine ili pomognu njihovom uklanjanju.

## **Biološki materijali za određivanje zastupljenosti proteina toplotnog stresa**

Ispitivanje proteina toplotnog stresa (HSP 70, ređe 27 i 90) se može izvršiti invazivnim tehnikama odnosno biopsijom iz parenhimatoznih organa (bubrezi, srce, jetra), mišićnog i masnog tkiva. Da bi se izvršila biopsija, životinja mora biti sedirana i pod lokalnom anestezijom, što značajno otežava samu metodologiju rada i uzimanje uzoraka. Mišićno tkivo se uzima biopsijom *m. longissimus thoracis* između 12. i 13. rebra pod lokalnom anestezijom. Veličina uzetog mišićnog tkiva je oko 3 g. Zatim se rana zašiva, tretira antibioticima i narednih nekoliko dana kontroliše kako zarasta (Carvalho i sar., 2014). Masno tkivo se uzima iz supkutisa na repu, koje je bilo pripremljeno šišanjem, pranjem i dezinfekcijom. Mesto biopsije se priprema po principima hirurške antiseptike, anestezirano je i skalpelom se zaseca koža u dužini od 1,5 do 2,5 cm. Za laboratorijske analize se uzima približno 3 g masnog tkiva, a uzorci se ispiraju fiziološkim rastvorom (Suni sar., 2019). Za razliku od prethodne invazivne metode, iz dlake, krvi, krvnog seruma i pljuvačke uzorci se mogu uzeti neinvazivnim tehnikama koje znatno olakšavaju uzimanje uzoraka, bezbolni su za životinju i ne stvaraju joj dodatni stres. Uzorci krvi se uzimaju punkcijom repne vene sa dodatkom EDTA odnosno bez dodatka konzervansa (serum) (Li i sar., 2015). Dlaka sa folikulom se uzima sa repa (25 do 30 dlaka). Pojedinačne dlake se uhvate što bliže koži i brzo iščupaju, a zatim se isperu vodom u kojoj je dietil pirokarbonat (DEPC) (Kim i sar., 2020). Uzorak mleka se uzima posle jutarnje muže u količini od 3 do 4 ml u epruvetu sa zatvaračem.

## **Metode određivanja proteina toplotnog stresa**

Ispitivanje proteina toplotnog stresa (HSP 70 kao proteina izbora za detekciju toplotnog stresa kod krava) se može izvršiti u svim gore navedenim materijalima. Metode koje se najčešće koriste za analizu proteina toplotnog stresa su određivanje prisustva proteina komercijalnim ELISA testovima, kao i utvrđivanje ekspresije odgovarajućih gena pomoću PCR. Nakon adekvatne pripreme uzorka, analiza komercijalnim ELISA testom je jednostavna i radi se prema uputstvu proizvođača, a rezultat ELISA testa čita se na talasnoj dužini od 450 nm. Ekspresija gena se može odrediti izolacijom i amplifikacijom DNK, kao i ekstrakcijom ukupne RNK korišćenjem specifičnih prajmera i sekvenci aminokiselina, pri čemu se koriste različiti prajmeri. U zavisnosti iz kog materijala se određuju proteini toplotnog stresa, koriste se različiti prajmeri (Habib i sar., 2017; Sun i sar., 2019; Hu i sar., 2020; Kim i sar., 2020).

## **ZAKLJUČAK**

Ispitivanja fizioloških mehanizama koji se razvijaju u osnovi toplotnog stresa i metoda koje se mogu koristiti u detekciji biomarkera toplotnog stresa poslednjih godina, u uslovima globalnog zagrevanja, dobijaju sve veći značaj. Kao najznačajniji biomarker toplotnog stresa kod visokomlečnih krava se koristi HSP70.

Njega je najbolje određivati u uzorcima krvi, mišićnog i masnog tkiva kao i dlake, metodom ELISA i PCR. Njegovo pravovremeno određivanje može da posluži farmerima u uspostavljanju protokola kojima bi se zaštitile životinje od posledica izloženosti toplotnom stresu tokom letnjeg perioda, ali i da izdvoje životinje koje imaju bolji genetski potencijal u pogledu tolerancije na toplotni stres.

**E mail autora za korespondenciju:** dani@vet.bg.ac.rs

## LITERATURA

Literatura (45 referenci) se može dobiti od autora za korespondenciju.