



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**  
Департман за ветеринарску медицину



**Мира Марковић**  
дипл. вет.

**ПАТОФИЗИОЛОШКИ МАРКЕРИ**  
**ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА**  
**ХЕПАТОЦИТА КРАВА ТРЕТИРАНИХ**  
**НИАЦИНОМ**

**Мастер рад**

**Нови Сад, 2025.**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**  
Департман за ветеринарску медицину



**Кандидат:**  
**Мира Марковић**

**Ментор:**  
**Др Марко Цинцовић**  
**ред.проф.**

**ПАТОФИЗИОЛОШКИ МАРКЕРИ**  
**ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА**  
**ХЕПАТОЦИТА КРАВА ТРЕТИРАНИХ**  
**НИАЦИНОМ**

**Мастер рад**

**Нови Сад, 2025.**

**КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ  
ДИПЛОМСКОГ МАСТЕР РАДА**

---

***Др Драгица Стојановић, редовни професор - председник***

*за ужу научну област Фармакологија и токсикологија*

*Пољопривредни факултет, Нови Сад*

*Департман за ветеринарску медицину*

---

***Др Марко Цинцовић, редовни професор - ментор***

*за ужу научну област Патологија*

*Пољопривредни факултет, Нови Сад*

*Департман за ветеринарску медицину*

---

***Др Мира Мајкић, доцент - III члан***

*за ужу научну област Болести животиња и хигијена анималних производа*

*Пољопривредни факултет, Нови Сад*

*Департман за ветеринарску медицину*

## **ПАТОФИЗИОЛОШКИ МАРКЕРИ ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА ХЕПАТОЦИТА КРАВА ТРЕТИРАНИХ НИАЦИНОМ**

### **САЖЕТАК**

*Циљ овог рада био је да се испита хепатопротективни утицај ниацина после његове апликације у перипарталном периоду, тако што ће се утврдити разлика у вредности метаболита значајни за функционални статус хепатоцита у узорцима пореклом од крава које су примале и које нису примале ниацин, као и да се утврди да ли хепатопротективни утицај ниацина расте са порастом оцене ниацинског статуса тако што ће се утврдити веза између вредности ниацинског статуса (НАД:НАДП) и шансе да краве имају очуване метаболичке параметре у оквиру референтних вредности. Ниацин показује хепатопротективну улогу јер помаже јетри у очувању секреторног капацитета што се види кроз вредности албумина и глукозе. Ниацин показује хепатопротективну улогу јер доводи до опадања липолизе, кетогенезе и акумулације масти у јетри, што се огледа кроз смањење вредности НЕФА, БХБ, пораст вредности холестерола и триглицерида и повољнији однос НЕФА:холестерол. Ниацин смањује оптерећење и некрозу хепатоцита и оптерећење жучних путева јер доводи до опадања активности јетриних ензима и концентрације билирбина. Ниацински статус који се огледа у НАД:НАДП индексу значајно указује на хепатопротективну функцију ниацина, тако да са порастом овог индекса постоји много већа шанса да се велики број биохемијских параметара нађе у оквиру референтне вредности него да њихове вредности буду неповољне односно изван референтне вредности. На основу разлике у вредности метаболита која се добија приликом апликације ниацина и односа вероватноћа да се метаболички параметри нађу у оквиру референтних вредности приликом бољег ниацинског индекса закључујемо да апликација ниацина код крава у перипарталном периоду показује хепатопротективну улогу.*

**Кључне речи:** краве, ниацин, хепатопротективни ефекат, метаболички профил.

**PATHOPHYSIOLOGICAL MARKERS OF HEPATOCYTE FUNCTIONAL  
STATUS IN COWS TREATED WITH NIACIN**

**SUMMARY**

*The aim of this study was to examine the hepatoprotective effect of niacin after its application in the peripartum period, by determining the difference in metabolite values significant for the functional status of hepatocytes in samples from cows that received and did not receive niacin, as well as to determine whether the hepatoprotective effect of niacin increases with increasing niacin status score by determining the relationship between winter niacin status values (NAD:NADP) and the chances of cows having preserved metabolic parameters within reference values. Niacin shows a hepatoprotective role because it helps the liver to preserve its secretory capacity, which can be seen through the values of albumin and glucose. Niacin shows a hepatoprotective role because it leads to a decrease in lipolysis, ketogenesis and fat accumulation in the liver, which is reflected in a decrease in NEFA, BHB, an increase in cholesterol and triglycerides and a more favorable NEFA:cholesterol ratio. Niacin reduces the load and necrosis of hepatocytes and the load on the bile ducts. because it leads to a decrease in the activity of liver enzymes and the concentration of bilirubin. The niacin status reflected in the NAD:NADP index significantly indicates the hepatoprotective function of niacin, so with an increase in this index, there is a much greater chance that a large number of biochemical parameters will be within the reference value rather than their values being unfavorable at the bottom outside the reference value. Based on the difference in the value of metabolites obtained during the application of niacin and the ratio of probabilities that the metabolic parameters are within the reference values with a better niacin index, we conclude that the application of niacin in cows in the peripartum period shows a hepatoprotective role.*

**Key words:** cow, niacin, hepatoprotective effects, metabolic profile.

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	2
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. МЕТАБОЛИЗАМ КРАВА У РАНОЈ ЛАКТАЦИЈИ И ФУНКЦИОНАЛНИ СТАТУС ХЕПАТОЦИТА.....	3
2.2. УТИЦАЈ НИАЦИНА НА МЕТАБОЛИЗАМ КОД КРАВА.....	6
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....	10
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА.....	11
4.1. АПЛИКАЦИЈА НИАЦИНА И МЕРЕЊЕ ЊЕГОВОГ ЕФЕКТА.....	11
4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА ХЕПАТОЦИТА.....	12
4.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	14
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА .....	15
5.1. УТИЦАЈ АПЛИКАЦИЈЕ НИАЦИНА НА ПОКАЗАТЕЉЕ ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА ХЕПАТОЦИТА .....	15
5.2. УТИЦАЈ НИАЦИНСКОГ СТАТУСА НА ПОСТИЗАЊЕ ХЕПАТОПРОТЕКТИВНОГ ЕФЕКТА.....	17
6. ДИСКУСИЈА.....	27
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	34
8. ЛИТЕРАТУРА.....	35

## 1. УВОД

Метаболичко престојавање код крава и хомеореза у раној лактацији одликује се променама метаболизма угљених хидрата, масти и протеина, који се усмеравају у том правцу обезбеђења надлазеће лактације. У том периоду дешава се повећана липолиза и кетогенеза које последично доводе до осталих метаболичких промена, а неретко и декомпензованих стања у виду метаболичких болести крава. Сви метаболички токови одвијају се у јетри. Јетра је главна лабораторија организма са више хиљада функција, па не чуди што у раној лактацији често настаје масна јетра код крава у комплексу са другим болестима. Масна јетра доводи до промене свих функционалних аспеката јетре, било да се ради о биосинтетској улози јетре, екскреторној улози или осталим улогама, уз настанак синдрома некрозе хепатоцита. Све ове промене доводе до значајних одступања у вредностима крвних параметара у метаболичком профилу крава и могу утицати на даље здравствене, дијагностичке и терапеутске токове и поступке. Због свега наведеног познато је да употреба ниацина (Б3 витамина) који има снажно антилиполитичко и антикетогено деловање код крава у раној лактацији може помоћи у заштити функционалног статуса хепатоцита. У овом раду је утврђено како апликација ниацина доводи до метаболички промена и каква је веза између ниацинског статуса крава и његовог хепатопротективног деловања.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. МЕТАБОЛИЗАМ КРАВА У РАНОЈ ЛАКТАЦИЈИ И ФУНКЦИОНАЛНИ СТАТУС ХЕПАТОЦИТА

Перипартални период је најкритичнија фаза у продуктивном и репродуктивном циклусу крава, јер се управо у том периоду одвијају метаболичке адаптације након телења, уз истовремене и нагле промене у неуроендокрином и метаболичком статусу животиња (Bell, 1995). Ове промене директно утичу на здравствено стање крава, продукцију млека, економичност и профитабилност говедарске производње у целини. Почетак лактације карактерише најинтензивније повећање енергетских потреба, које је често веће од потреба за развој фетуса у завршној фази гестације. Цео организам краве је у овом периоду усмерен на метаболичко прилагођавање, јер у перипарталном периоду унос хране не може задовољити енергетске потребе, што доводи до негативног енергетског биланса.

Све количине хране које краве конзумирају су знатно мање од потреба за лактацију, што као последицу има брзу мобилизацију масти из телесних резерви због повећане производње млека и смањеног апетита. Током максималне мобилизације хранљивих материја из телесних депоа, јављају се последице које значајно утичу на енергетски статус, као и на повећање ризика за развој бројних метаболичких, репродуктивних и инфективних болести (Vobe и сар., 2004). Метаболичке промене карактеришу повећана липидна мобилизација из масних депоа уз повишене концентрације неестерификованих масних киселина (НЕФА) и њихову појачану употребу у периферним ткивима, смањена потрошња глукозе у периферним ткивима, снижен ниво глукозе у крви, повећана глуконеогенеза и смањена употреба ацетата (Ђоковић, 2010). Пошто ове метаболичке промене погађају цео организам, оне представљају и облик стреса који се огледа у повишеној концентрацији кортизола, који је познат по свом утицају на липомобилизацију и глуконеогенезу (Pere и сар., 2000).

У периоду око партуса периферна ткива појачано користе масти као извор енергије, омогућавајући да глукоза буде преусмерена ка плоду и млечној жлезди. Хормон раста, који делује као антагонист инсулину, омогућава повећану

потрошњу хранљивих материја у млечној жлезди (Ingvarsen и Andersen, 2000). Јетра се активира за коришћење резерви гликогена због повећаних енергетских потреба. Повећана употреба масних резерви у периферним ткивима и њихов метаболизам у јетри доводе до формирања кетонских тела и триглицерида и њиховог акумулирања. Ове метаболичке адаптације служе подршци лактацији, а млечна жлезда преузима апсолутни приоритет у коришћењу хранљивих материја. Синтеза млечних протеина зависи од аминокиселина из крви, производња млечне масти од масних киселина као прекурсора, док лактоза настаје кондензацијом глукозе и галактозе. Топлотни стрес може смањити продукцију и квалитет млека јер се глукоза троши за потребе периферних ткива (Belić и сар., 2011). Млечна жлезда има предност у коришћењу глукозе и због присуства инсулин независних рецептора, док периферна ткива поседују инсулин зависне рецепторе чија се густина током лактације смањује како би се подржала продукција млека (Cant и сар., 2002; Komatsu и сар., 2005).

Стадијум лактације и ниво млечности значајно утичу на способност адаптације крава током рестрикције хране (Bjerre-Narpoth и сар., 2012). У раној лактацији гликемија је најнижа, а НЕФА и БХБ достижу највише вредности (Gross и сар., 2011). Смањење исхране у овом периоду доводи до пада продукције млека и повећане липидне мобилизације, настаје кетогенеза и смањује се концентрација глукозе у крви, што је код говеда нарочито значајно јер имају природно ниску гликемијску вредност. Просечна гликемија преживара је нижа него код непреживара и код здравих крава у препарталном периоду одржава се унутар физиолошких граница (2,2–4,16 mmol/l) (Kaneko и сар., 2008; Ivanov и сар., 2005).

Перипартални период, у ком доминира негативан енергетски биланс, повећана потрошња масти у периферним ткивима и велика потрошња глукозе за лактацију, доводи до снижења гликемије и повећања концентрације НЕФА. Повећана употреба НЕФА у јетри доводи до формирања кетонских тела, а у крви расте концентрација БХБ. Код крава у последњем месецу гравидитета концентрација НЕФА треба да буде испод 0,4 mmol/l, док краве са клиничким знацима кетозе имају концентрацију изнад 1,5 mmol/l (Emery и сар., 1992). Снижена концентрација глукозе у крви уз повишене концентрације НЕФА и БХБ јасан је метаболички индикатор лошег енергетског статуса (Cincović и сар., 2011).

Гликемијске вредности значајно падају око партуса због смањеног уноса хране и преусмеравања глукозе ка млечној жлезди и утерусу (Bell и Bauman, 1997).

Хепатична глуконеогенеза је хомеоретска адаптација метаболизма глукозе, користећи лактат, аланин, пропионат и глицерол као прекурсоре (Johnson, 2008). У Коријевом циклусу настаје лактат, пропионат је продукт руминалне ферментације, глицерол потиче из катаболизма масног ткива, а аланин из протеинског катаболизма.

Током негативног енергетског биланса, НЕФА се катаболишу у свим ткивима, а најинтензивније у јетри, која је централни метаболички орган. Метаболички путеви укључују: потпуну оксидацију масних киселина до воде и CO<sub>2</sub>; делимичну оксидацију до ацетил-КоА и синтезу кетонских тела (БХБ); формирање триглицерида и њихов транспорт путем ВЛДЛ; ресинтезу триглицерида и њихово накупљање уз масну дегенерацију јетре. Јетра такође појачано спроводи глуконеогенезу користећи све доступне хранљиве материје из варења (Goff и Horst, 1997). Основни процес глуконеогенезе је повећана активност пируват карбоксилазе и повећана експресија њене иРНК, која омогућава коришћење аминокиселина (Greenfield и сар., 2002).

Гликогенолиза у јетри омогућава ослобађање шећера за покретање лактације. Глуконеогенеза се врши из неугљених компоненти (НЕФА и протеина) како би се обезбедила довољна количина глукозе за лактацију. Смањена осетљивост јетре на хормон раста повећава концентрацију СТХ, што потенцира усмеравање шећера и градивних материја ка вимену и масти ка јетри. Повишен СТХ повећава употребу хранљивих материја у млечној жлезди ради синтезе млека. Насупрот СТХ и кортизолу, ниво инсулина је снижен због мањег уноса хране и смањене рецепторске активности узроковане СТХ (Cincović и сар., 2011). Ови процеси заједно доводе до кетозе и масне инфилтрације јетре (Šamanc, 2009). Однос концентрација НЕФА и холестерола може служити као индиректан показатељ масне инфилтрације јетре (Van Saun, 2000; Šamanc, 2009).

Смањење тиреоидних хормона након тељења доводи до непотпуне оксидације НЕФА у хепатоцитима, што узрокује реестерификацију и синтезу триглицерида (Nikolić и сар., 2003). Масна јетра се брже развија у случају хипотиреоидозе у периоду засушења (Šamanc и сар., 2010b). Триглицериди и

холестерол у серуму падају због смањене продукције ВЛДЛ, док се билирубин и активност јетриних ензима повећавају. Сви ови процеси – повишен СТХ, снижен инсулин, повећани кетони и НЕФА – доводе до смањеног апетита код крава (Ingvarstsen и сар., 2000). Генетска склоност ка високој продукцији млека такође доприноси замашћењу јетре (Vobe и сар., 2004). На почетку лактације, када су потребе за глукозом повећане, хепатична глуконеогенеза расте користећи пропионат, лактат, аланин и глицерол као прекурсоре. Непожељни метаболички пут НЕФА који штетно делује на јетру има два исхода: делимична оксидација која ствара кетонска тела, пре свега БХБ, и синтезу триглицерида са њиховим накупљањем у хепатоцитима, што представља масну инфилтрацију. Концентрација НЕФА расте десетак дана пре тељења, достиже максимум у време тељења или седмог дана након почетка лактације (Kokkonen и сар., 2005).

Оксидација НЕФА, њихова реестерификација и уградња у триглицериде контролисани су јетриним ензимима, чија функција зависи и од иРНК. Код крава са кетозом или масном јетром, активност глукозо-6-фосфатазе и пируват карбоксилазе је смањена, уз ограничену глуконеогенезу (Loog и сар., 2007; Sinović и сар., 2010). Масна јетра настаје када нови прилив масних киселина не може да се оксидише и наставља у крвоток. Код преживара, *de-novo* синтеза масних киселина у јетри је минимална (Drackley, 2000), што указује да је главни узрок масне јетре повећан прилив НЕФА у хепатоците, а не њихова *de-novo* синтеза.

## **2.2. УТИЦАЈ НИАЦИНА НА МЕТАБОЛИЗАМ КОД КРАВА**

Различите хемијске супстанце које показују исту биолошку активност називају се витамери, што је случај са витамином Б3, јер никотинска киселина и никотинамид представљају две хемијски различите форме истог витамина. Витамини чине хетерогену групу једињења, а основна класификација се базира на њиховим физичким особинама – растворљивости у води (хидрофилни витамини) и у мастима (липофилни витамини). Витамин Б3, као и остали витамини Б комплекса, у потпуности је растворљив у води. Једна од кључних карактеристика

витамина је да су органска једињења која су потребна у врло малим количинама (микрограми или милиграми дневно) у исхрани како би се одржали нормални метаболички процеси и опште здравље (Bender, 2003).

Хемијско име витамина Б3 за никотинску киселину је 3-пиридинкарбоксилна киселина (3-pyridinecarboxylic acid), са формулом  $C_6H_5NO_2$ , док је за никотинамид 3-пиридинкарбоксиамид (3-pyridinecarboxamide) са формулом  $C_6H_6N_2O$ . Витамин је такође познат и под именима Пелагрин, Амид никотинске киселине, Ниацинамид, Витамин ПП и антипелагра витамин (Yalkowsky и Yan, 2003; O'Neil, 2006).

У организму се ниацин уграђује у коензиме никотинамид аденин динуклеотид (NAD) и никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADP), што има значајну улогу у енергетском метаболизму. NAD учествује у многим оксидо-редукционим реакцијама као носач електрона, при чему може примити или предати електрон у реакцијама редукције или оксидације. Када се  $NAD^+$  редукује прихватањем електрона, формира се NADH, и тада је  $NAD^+$  оксидативно средство; обрнуто, када NADH донира електрон, никотинамид се оксидује, делујући као редукционо средство и постаје NAD. NAD је такође прекурсор за два секундарна гласника (сADP-рибоза и NADP), који подстичу повећање концентрације калцијума унутар ћелије.

Извори ниацина могу бити из хране, али га животиње могу и синтетисати ензимском биохемијском модификацијом триптофана и кинолонске киселине. Такође, бујна микрофлора у преджелуцима има способност синтезе ниацина, при чему микроорганизми користе аспартат и диоксиацетон фосфат за продукцију ниацина (Henderson, 1983). Ниацин позитивно утиче на микрофлору, посебно на протозое које не могу саме синтетисати витамин Б3, што доводи до значајног повећања броја протозоа у садржају преджелуца након примене незаштићеног ниацина у исхрани (Doreau и Ottou, 1996; Niehoff и сар., 2013). Развој микрофлоре у преджелуцима обично повећава концентрацију амонијака ( $NH_3-N$ ), па се повећање амонијака услед ниацина може тумачити порастом популације протозоа (Riddell и сар., 1980).

Антилиполитички ефекат никотинске киселине познат је од почетка 1960-их (Carlson, 1963). Током пери-парталног периода, концентрација слободних

масних киселина у плазми (NEFA) код млечних крава је повећана. NEFA су главни састојци триглицерида, који се састоје од три масне киселине везане за глицерол и представљају главни депо масти у организму. Катаболизам триглицерида укључује хидролизу у масном ткиву преко хормон-осетљиве липазе, ослобађајући NEFA и глицерол. Краве мобилишу масне киселине као одговор на метаболичке промене и негативан енергетски биланс. Студије *in vivo* показују да примена фармаколошких доза никотинске киселине смањује ниво NEFA у плазми тако што инхибира липолизу код говеда (Morey и сар., 2011; Titgemeyer и сар., 2011).

Овај антилиполитички ефекат никотинске киселине вероватно се остварује преко ниацинског рецептора GPR109A код говеда, који се налази у адипозном ткиву, имунолошким ћелијама, мишићима, мозгу и јетри (Titgemeyer и сар., 2011). Никотинамид, са друге стране, има веома мали афинитет везивања за GPR109A (Gille и сар., 2008). Слична ситуација је код људи, где је ендогени лиганд за GPR109A ВНВ, док никотинамид функционише као парцијални агонист и не може да мења липидни профил у плазми (Taggart и сар., 2005). Активирање GPR109A никотинском киселином доводи до инхибиције аденил-циклазе и смањења cAMP у ћелијама. Нижи ниво cAMP у адипоцитима доводи до инактивације протеин киназе А и смањења фосфорилације хормон-осетљиве липазе, чиме се смањује липолиза (Gille и сар., 2008). Никотинска киселина је снажан антилиполитички суплемент код говеда током негативног енергетског биланса, јер током периода смањене исхране стално мобилишу телесне резерве, а одрживо смањење NEFA може се постићи све док је никотинска киселина присутна у исхрани крава (Pires и Grummer, 2007).

Високе концентрације NEFA током негативног енергетског биланса могу довести до развоја масне јетре и настанка кетозе. Превенција кетозе могућа је применом ниацина самог или у комбинацији са прекурсорима гликогена, као што су пропилен гликол или натријум пропионат (Overton и Waldron, 2004; Weiss и Gonzalo, 2006). Суплементација ниацином смањује концентрацију ВНВ и NEFA у плазми, док одржава стабилан ниво глукозе (Dufva и сар., 1983). Инсулинска резистенција код крава настаје због приоритетне употребе глукозе за раст плода, развој вимена и лактацију, а повезана је са повећаном концентрацијом NEFA у плазми (Pires и сар., 2007). Ниацин може смањити инсулинску резистенцију тако

што смањује липолизу и повећава гликемију, што може побољшати секреторну активност и ефикасност инсулина. Познато је да ниацин смањује липолизу и подиже ниво глукозе у крви, чиме може повећати ефикасност инсулина и смањити инсулинску резистенцију. Никотинска киселина повећава ниво глукозе у крви, иако тачан механизам деловања још није у потпуности разјашњен (Stefan и сар., 2003). Претпоставља се да делује повећањем продукције глукозе у јетри или смањењем њеног клиренса у крви, или комбинацијом оба ефекта. Ако концентрација инсулина прати динамику глукозе, то указује на смањење инсулинске резистенције (Titgemeyer и сар., 2011).

### 3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задаци овог мастер рада су да се одаберу краве у перипарталном периоду, да се изврши апликавање ниацина кроз храну кроз целокупан перипартални (транзициони период) и да се на недељном нивоу узима крв како би се утврдио ниацински статус организма крава и вредност метаболита који су од значаја при процени функционалног статуса хепатоцита.

Циљ овог мастер рада је да се испита хепатопротективни утицај ниацина после његове апликације у парипарталном периоду, тако што ће се утврдити разлика у вредности метаболита значајни за функционални статус хепатоцита у узорцима пореклом од крава које су примале и које нису примале ниацин, као и да се утврди да ли хепатопротективни утицај ниацина расте са порастом оцене ниацинског статуса тако што ће се утврдити веза зимешу вредности ниацинског статуса (НАД:НАДП) и шансе да краве имају очуване метаболичке параметре у оквиру референтних вредности.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

### 4.1. АПЛИКАЦИЈА НИАЦИНА И МЕРЕЊЕ ЊЕГОВОГ ЕФЕКТА

Оглед је извршен на 30 крава Холштајн-фризијске расе у другој и трећој лактацији, клинички здраве, уз производњу млека 6700-8800 литара. Краве су гајене у слободном систему, на дубокој простирци, али се у транзиционом периоду биле у породилишу, где је постојао везани систем. Исхрана крава је оброчна, док је у породилишту после партуса била по вољи. Краве су храњене миксованим оброком којим се задовољавају комплетне потребе крава, а вода им је давана *ad libitum*. Оброк за краве у раној лактацији се прави да задовољи следеће стандарде: протеини (17,5-19,5% СМ сирових протеина, 30-33% разградивих протеина од укупних, 35-40% неразградивих протеина од укупних); угљени хидрати (АДФ минимум 17-21%, НДФ минимум 28-31%, НДФ из кабасте хране минимум 18-23%, неструктурни угљени хидрати 35-42%, ниво суве материје из кабасте хране минимум 40-45%); енергија (НЕЛ 7-7,4 MJ/kg суве материје оброка); масти у оброку 5-7%. АДФ и НДФ су две фракције целулозе. НДФ је неутрална детерцент целулоза у коју спада целулоза, хемицелулоза и лигнин, а АДФ је кисела детерцент целулоза у коју спада целулоза и лигнин. Главна разлика међу њима је у степену конзумације и сварљивости.

Ниацин је апликован путем хране *per os*. Коришћен је Rovimix®Niacin у дози која омогућује доступност у цревима око 6-12g ниацина/дан (60-120g крава/дан у храни), што се у претходним истраживањима показало као оптимална биолошка концентрација. Ниацин је апликован у периоду две недеље пре, као и три недеље после тељења.

Крв је узимана паралелно и у литијум-хепаринске вакутајнере, за потребе анализе НАД и НАДП. НАД и НАДП су одређени помоћу колориметријске ELISA методе из лизата еритроцита. Стандардни китови садрже специфичне

ензиме (cycling enzyme mix) који препознају НАД односно НАДП, па није потребна њихова претходна пурификација. Резултати су изражени као pmol /10<sup>6</sup>еритроцита. Овај број еритроцита се налази у једном микролитру крви, а када се резултат помножи са 100 добија се вредност НАД односно НАДП који се налази у једном ml. Коришћени су китови произвођача Abscam. Однос НАД/НАДП је израчунат простим дељењем два броја.

## **4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА ХЕПАТОЦИТА**

Узорци крви су узимани венепункцијом из репне вене (*v.coccigea*) у серумске вакутајнере. Након тога, узорци крви су транспортовани у Лабораторију за патолошку физиологију, Департман за ветеринарску медицину, где је после центрифугирања и издвајања серума вршена биохемијска анализа крви. Приликом анализе метаболичког профила крва, коришћене су фотометријске реакције и фотометар Chemray произвођача Rayto (Кина). Фотометрисање је вршено на таласној дужини и у временском интервалу према спецификацији произвођача. Коришћени су стандардни китови произвођача Biosystems (Шпанија).

НЕФА- Концентрација НЕФА одређивана је колориметријском реакцијом која се заснива на ацилацији коензима А од стране масних киселина у присуству додане acil-CoA синтетазе као катализатора. Acil-CoA се оксидише под дејством додате acil-CoA оксидазе уз производњу водоник пероксида. Водоник пероксид у присуству пероксидазе дозвољава оксидативну кондензацију 3-мети-N-етил-N(β-хидроксиетил)-анилина (MEFA) са 4-аминоантипиримином што даје љувичасту боју.

Однос НЕФА:холестерол као показатељ склоности јетре ка липидози добијен је рачунским путем.

БХБ- Одређивање БХБ-а се базира на његовој оксидацији до ацетоацетата помоћу 3-хидроксибутирата дехидрогеназе. Истовремено се овим кофактор NAD<sup>+</sup> се редукује до NADH, што доводи до развоја боје.

Глукоза- Одређивање глукозе врши се после њене ензиматске реакције у присуству глукоза-оксидазе. Добијени водоник-пероксид у овој реакцији даље

реагује са 4-аминофеназоном и фенолом у присуству пероксидазе као катализатора. Добија се црвено-љубичаста боја чији се интензитет мери.

Укупни протеини- Протеини у серуму реагују са бакарним јоном и у алкалном раствору дају љубичасти бојени комплекс. Интензитет љубичасте боје је пропорционалан концентрацији протеина.

Албумини- Албумини везани за бромкрезол зелено дају интензивно зелено бојење пропорционално концентрацији албумина.

Глобулини – су израчунати као разлика укупних протеина и албумина.

Холестерол- Холестерол се одређује после ензиматске хидролизе холестерол естера под дејством холестерол естеразе, када се добија холестерол и масне киселине. Издвојени холестерол се оксидише под дејством додате холестерол-оксидазе, када се формира водоник-пероксид. Водоник пероксид реагује са фенолом и 4-аминоантипирином под дејством пероксидазе дајући обојени квинонеимин.

Триглицериди- Триглицериди се одређују ензиматском реакцијом. Триглицериди под дејством липаза дају глицерол и масне киселине. Добијени глицерол са АТР-ом под утицајем глицерол киназе даје глицерол-3-фосфат, који даље оксидише под дејством додате глицерол-3-фосфат оксидазе. Производ ове реакције је водоник пероксид који са 4-аминофеназоном и 4-хлорфенолом под дејством пероксидазе даје обојени квинонеимин.

Укупни билирубин- Билирубин везан за протеине се најпре одводи под деловањем детерџента. Укупни билирубин реагује са 2,4-дихлороанилин-ом у присуству хидрохлорне киселине, дајући обојени азобилирубин.

АСТ- АСТ је ензим који катализује амно-групе са L-аспартата на  $\alpha$ -кетоглутарат, када се добија L-глутамат и оксалацетат. Оксалацетат са NADH и H под дејством малат-дехидрогеназе као катализатора даје обојени L-малат и NAD<sup>+</sup>.

АЛТ- АЛТ је ензим који катализује трансфер амино-групе са L-аланина на  $\alpha$ -оксоглутарат, када се добија L-глутамат и пируват. Пируват са NADH и H под дејством лактат-дехидрогеназе као катализатора даје обојени L-лактат и NAD<sup>+</sup>.

ГГТ- Гама-глутамилтрансфераза је ензим који катализује реакцију између L- $\gamma$ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилидина-а и глицилглицина, када се добија обојени 5-амино-2-нитробензоат.

АЛП- Алкална фосфатаза катализује хидролизу р-нитрофенил фосфата, када се добија фосфат и р-нитрофенол, који даје бојену реакцију.

Индекс функционалности хепатоцита (liver functionality index) израчунат је према формули:  $LFI = (ALB - 17,71)/1,08 + (CHOL - 2,57)/0,43 - (TBIL - 4,01)/1,21$ . (Trevisi и Minuti, 2018).

### 4.3. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Укупан број анализираних тачака је 90. Једна тачка представља један узорак добијен од једне краве у једној недељи истраживања. Како је у огледу учествовало 30 крава кроз три недеља огледа укупан број анализираних тачака је 90.

Утицај ниацина на параметре јетре и одређен је испитивањем статистичке разлике у вредности испитиваних метаболичких параметара код крава које су примале и које нису примале ниацин. Коришћен је т-тест.

Ефекат третмана ниацином на параметре хепатоцита испитан је утврђивањем везе између вредности ниацинског статуса *iskazanog* као НАД:НАДП и односа шанси (енгл., odds ratio, OR) да се испољи хепатопротективни ефекат у функцији пораста вредности НАД:НАДП количника. Хепатопротективни ефекат је постојао уколико су испитивани параметри били у оквиру референтне вредности (обележено са 1), а уколико су вредности биле изван референтних тада се сматра да није постојао хепатопротективни ефекат (обележено са 0). Вредност НАД:НАДП је подељена на дециле, па је за сваки ниво НАД:НАДП израчунат однос шанси да се испитивани параметар нађе у оквиру референтне вредности у перипарталном периоду, чиме се потврђује функционална стабилност хепатоцита и протективна улога ниацина. Представљене су позиционе вредности децила у дистрибуцији фреквенције вредности НАД:НАДП односа, као и учесталост крава које су примале и које нису примале ниацин за сваку групу децила посебно. OR је мера величине учинка (енгл., effect size) и он говори о јачини повезаности две варијабле (McHugh, 2009). У нашем огледу OR је коришћен за израчунавање шансе да ће неки догађај наступити због квалитетнијег ниацинског статуса организма. Тако је здравствени исход у смислу очувања функције јетре која се види кроз вредност биохемијских параметара који остају у референтној вредности утврђена у функцији изложености ниацину односно различитим нивоима ниацинског статуса организма.

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

### 5.1. УТИЦАЈ АПЛИКАЦИЈЕ НИАЦИНА НА ПОКАЗАТЕЉЕ ФУНКЦИОНАЛНОГ СТАТУСА ХЕПАТОЦИТА

Апликација ниацина значајно утиче на вешину параметара показатеља функционалног статуса хепатоцита. Апликација ниацина доводи до пораста концентрација албумина ( $p < 0.01$ ), глукозе ( $p < 0.01$ ), триглицерида ( $p < 0.01$ ) и вредности индекса функционалног статуса јетре ( $p < 0.01$ ), док је нађена смањења концентрација БХБ ( $p < 0.01$ ), НЕФА ( $p < 0.01$ ), холестерола ( $p < 0.05$ ), однос НЕФА:Холестерол ( $p < 0.01$ ), као и вредност АЛТ ( $p < 0.05$ ), ГГТ ( $p < 0.05$ ) и укупног билирубина. Апликацијај ниацина није утицана на вредност укупних протеина, глобулина, као ни на активност АСТ и АЛП.

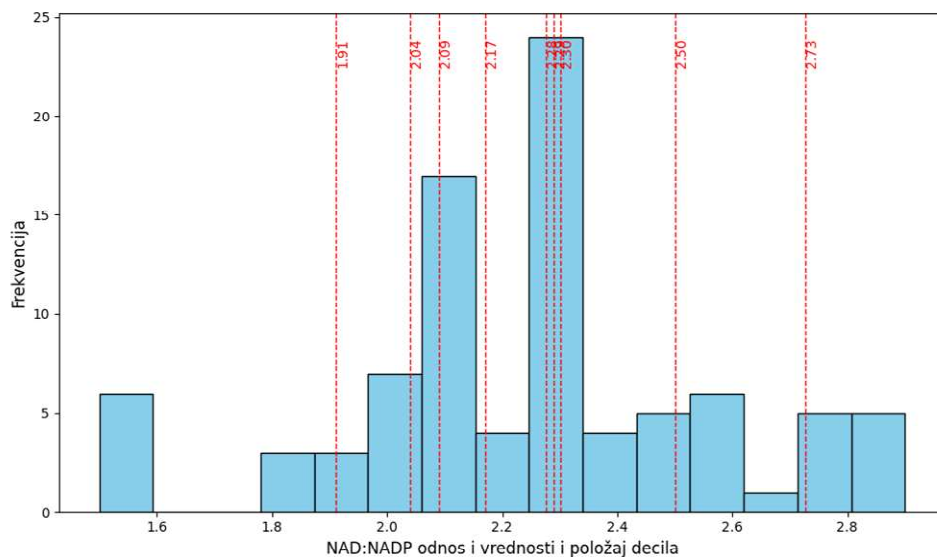
Ниацин показује хепатопротективну улогу јер помаже јетри у очувању секреторног капацитета што се види кроз вредности албумина и глукозе. Он доводи до опадања липолизе, кетогенезе и акумулације масти у јетри, што се огледа кроз смањење вредности НЕФА, БХБ, пораст вредности холестерола и триглицерида и повољнији однос НЕФА:холестерол. И на крају, ниацин смањује оптерећење и некрозу хепатоцита и оптерећење жучних путева јер доводи до опадања активности јетриних ензима и концентрације билирбина. Наведени резултати су приказани у Табели 1.

Табела 1: Утицај апликације ниацина на вредност метаболичких параметара показатеља

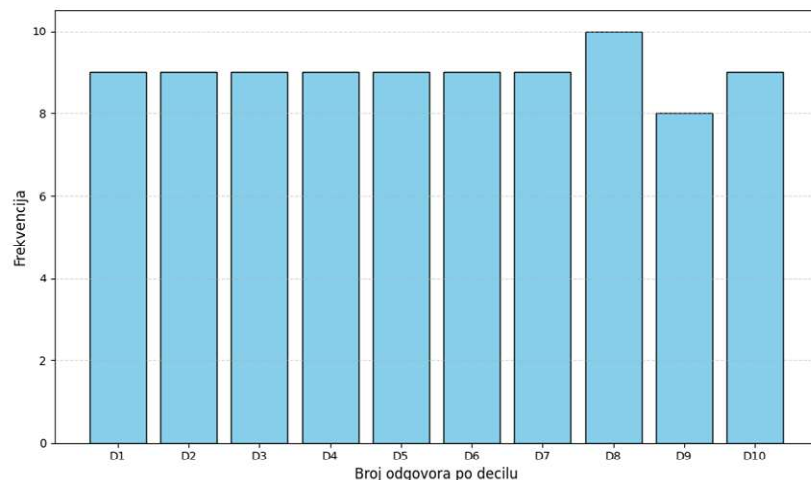
	Ниацин	Контрола	p
Укупни протеини (g/L)	69,6±1,9	68,1±2,2	NS
Албумини (g/L)	38,9±1,9	35,3±2,1	<0.01
Глобулини (g/L)	30,7±2,1	32,8±1,9	NS
БХБ (mmol/L)	0,65±0,22	0,99±0,27	<0.01
НЕФА (mmol/L)	0,44±0,21	0,82±0,3	<0.01
Холестерол (mmol/L)	2,6±0,54	3,3±0,45	<0.05
НЕФА:Холестерол	0,17±0,03	0,22±0,02	<0.01
Триглицериди (mmol/L)	0,26±0,05	0,14±0,07	<0.01
АСТ (IU/L)	85,1±9,12	81,2±8,69	NS
АЛТ (IU/L)	29,8±4,2	34,9±5,3	<0.05
ГГТ (IU/L)	31,5±4,8	37,2±6,2	<0.05
АЛП (IU/L)	91,2±5,6	88,8±7,1	NS
Укупни билирубин (μmol/L)	6,94±1,54	8,58±2,43	<0.05
Индекс функције јетре	22,6±7,6	14,1±7,2	<0.01
Глукоза (mmol/L)	2,95±0,27	2,45±0,19	<0.01

## 5.2. УТИЦАЈ НИАЦИНСКОГ СТАТУСА НА ПОСТИЗАЊЕ ХЕПАТОПРОТЕКТИВНОГ ЕФЕКТА

Децили НАД:НАДП односа - На основу анализе децилних граница и фреквенција, резултати показују да се најмањих 10% вредности налази у опсегу од приближно 1.500 до 1.552, док следећих 10% вредности заузима опсег од 1.552 до 1.785, што указује на присуство неколико ниских екстремних вредности. Податци у средњем делу расподеле, од D3 до D8, налазе се у опсезима од 1.786 до 2.400, са највећом концентрацијом око централних вредности од 2.0 до 2.3, што означава да већина података припада средини расподеле. Вредности изнад средине, обухваћене децилним групама D7 и D8, крећу се од 2.206 до 2.400, док највећих 10% података припада опсегу од 2.693 до 2.900, показујући присуство неколико високих екстремних мерења. Укупно, ова анализа показује да је расподела података благо асиметрична са концентрацијом у средњем опсегу и присуством ретких екстремних вредности на оба краја.

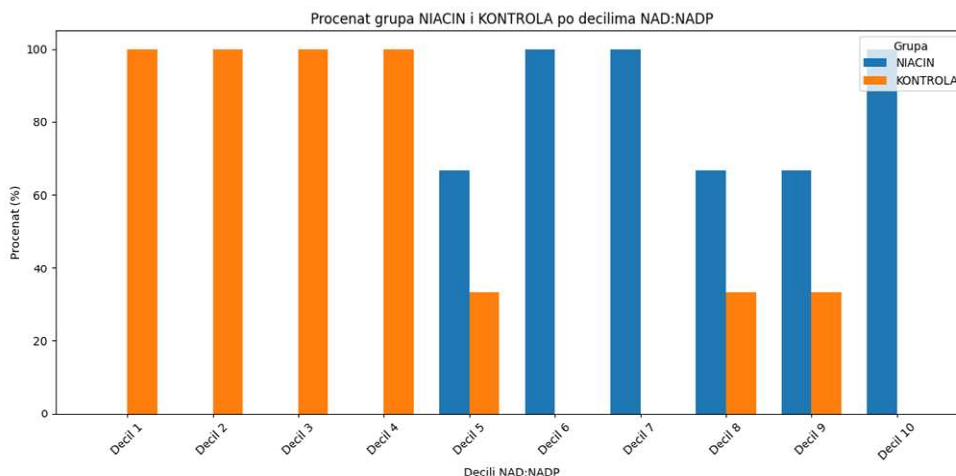


Графикон 1. Дистрибуција фреквенције вредности НАД:НАДП односа и положај децила



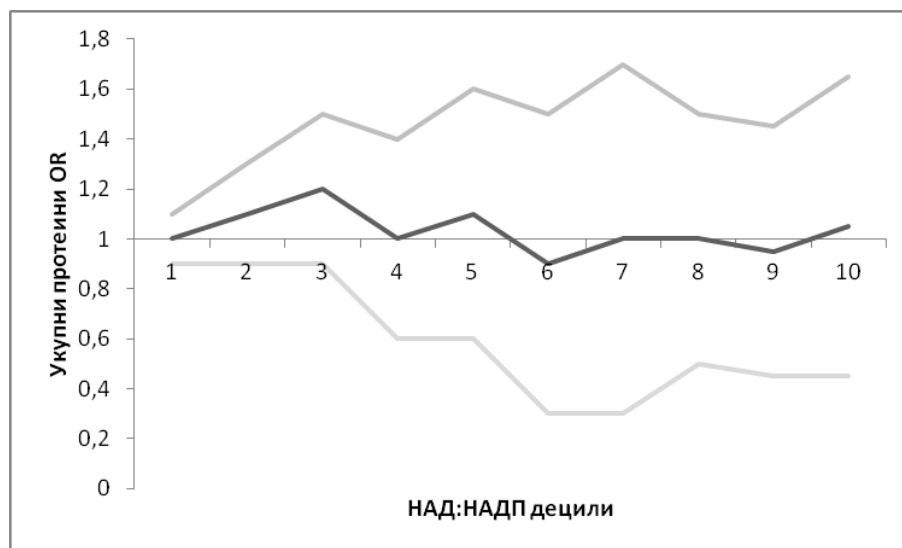
Графикон 2. Број животиња чије се вредности НАД:НАДП односа налазе у различитим децилима

Децили са нижим NAD:NADP вредностима имају већу заступљеност групе KONTROLA, док су децили са вишим NAD:NADP вредностима доминирани групом NIACIN. Поредак обе групе унутар сваког децила омогућава лаку визуелизацију начина на који се њихов удео мења како NAD:NADP расте. Другим речима, графикон јасно приказује тренд повећања удела групе NIACIN у вишим децилима NAD:NADP и смањење удела групе KONTROLA.

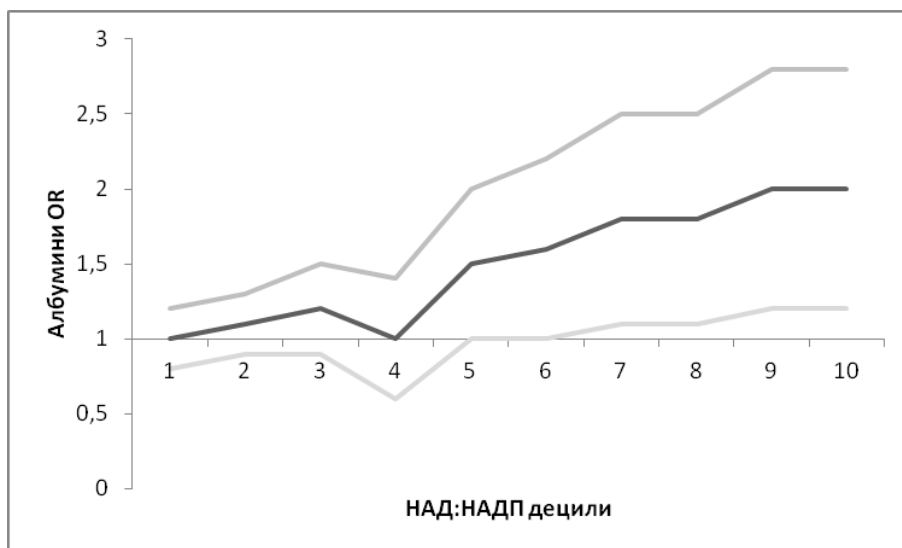


Графикон 3. Однос јединки које су примале и које нису примале ниацин у различитим децилима вредности НАД:НАДП односа

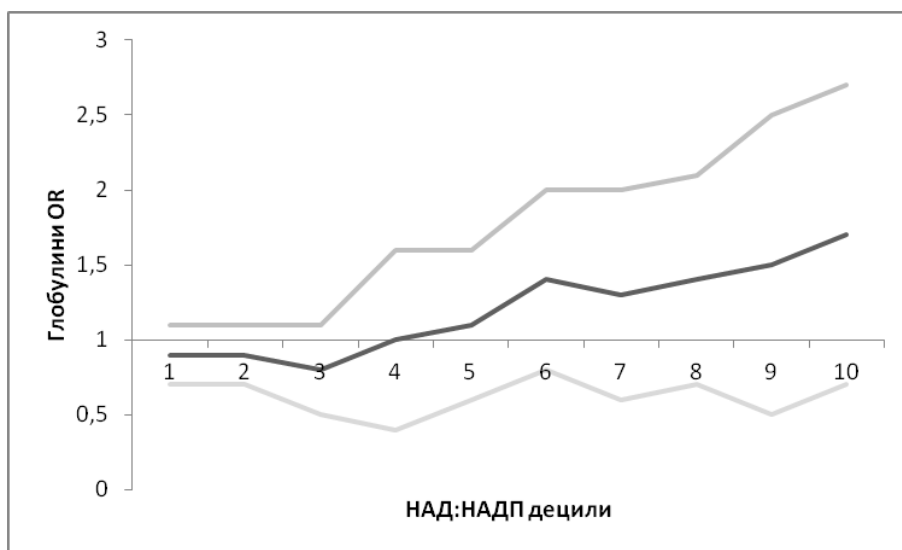
Ниацински статус који се огледа у НАД:НАДП индексу значајно указује на хепатопротективну функцију ниацина, тако да са порастом овог индекса постоји много већа шанса да се велики број биохемијских параметара нађе у оквиру референтне вредности него да њихове вредности буду неповољне односно изван референтне вредности. За највећи број параметара са порашћу вредности НАД:НАДП расте шанса да се у узорку налази неки параметар у оквиру референтне вредности у односу на неповољан налаз који значи вредност параметара изван референтне вредности. Оваква налаз је присутан најчешће изнад 5. децила вредности НАД:НАДП количника, што одговара оним вредностима индекса који припадају крвама које су примале ниацин. Овај тренд није утврђен за укупне протеине, глобулине и активности АСТ и АЛП. Резултати су приказани за сваки параметар посебно на графиконима 4 до 18.



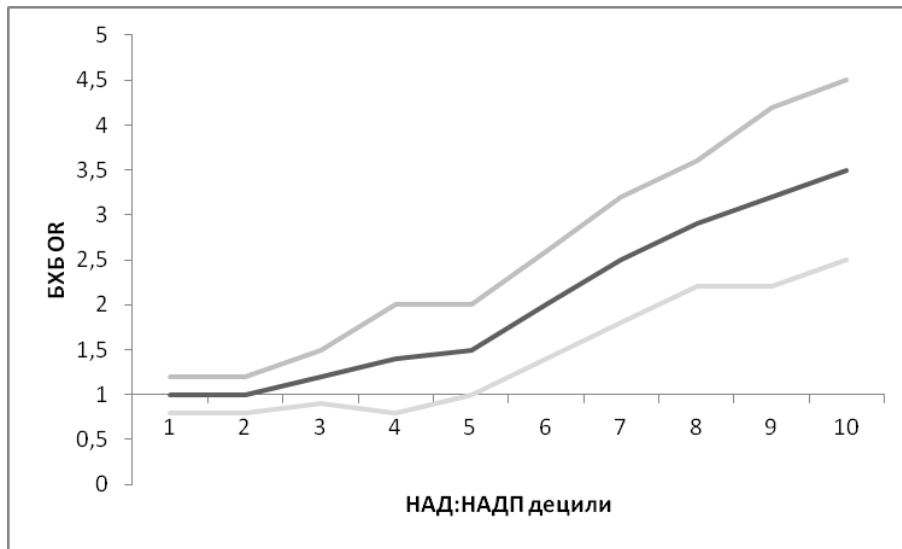
Графикон 4. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност укупних протеина у референтним вредностима.



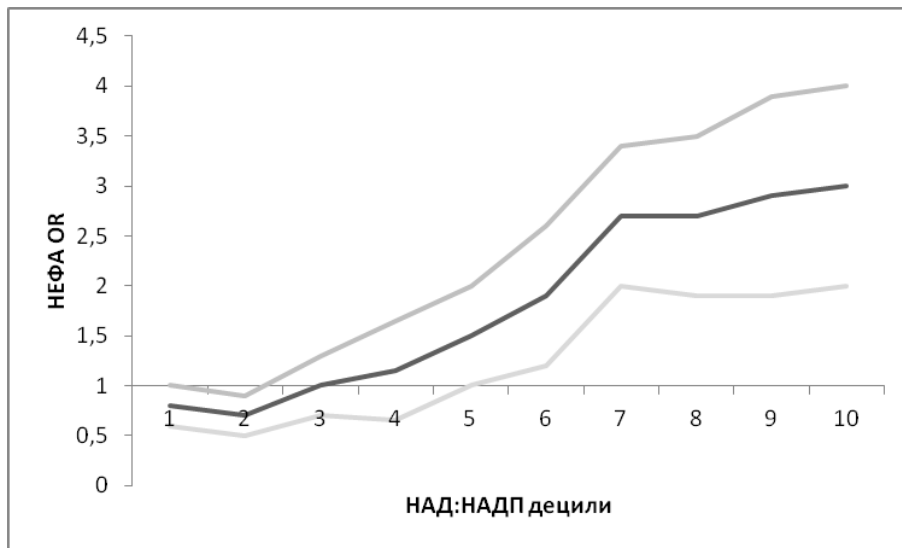
Графикон 5. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност албумина у референтним вредностима.



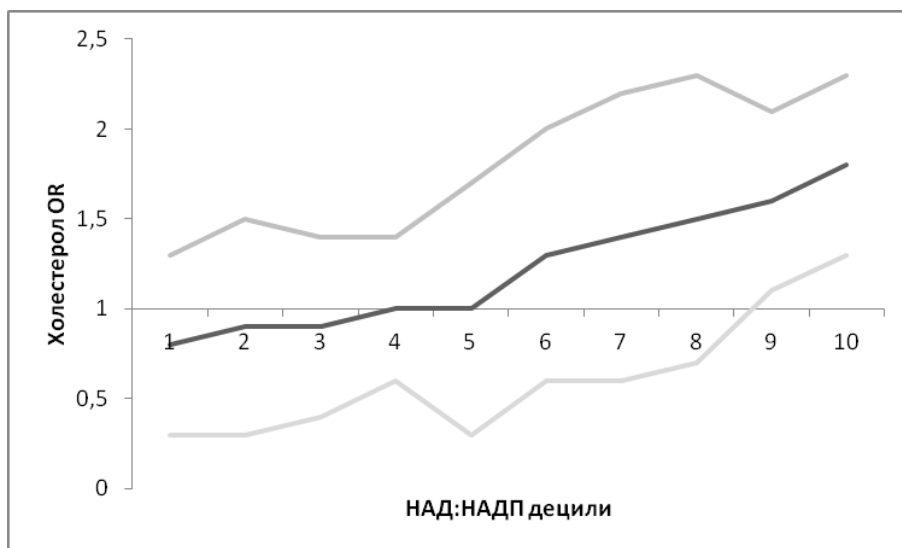
Графикон 6. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност глобулина у референтним вредностима.



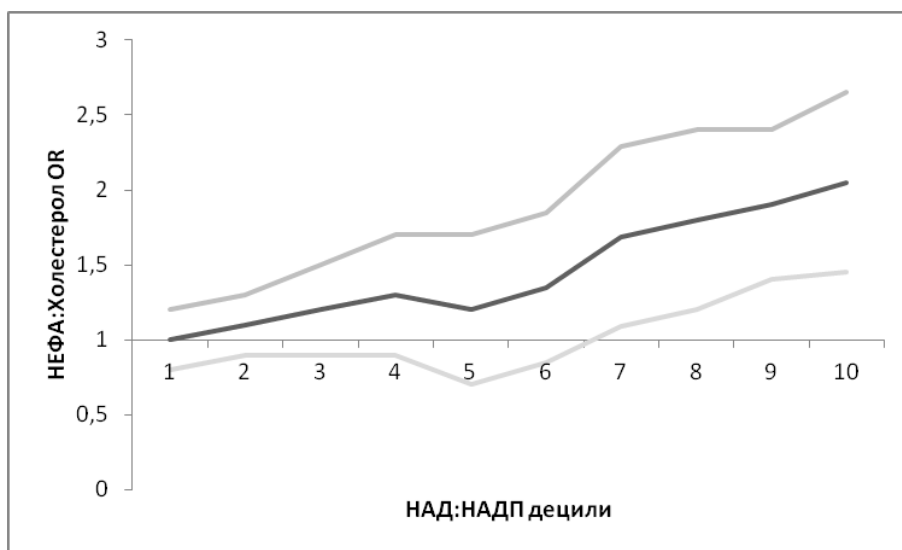
Графикон 7. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност БХБ у референтним вредностима.



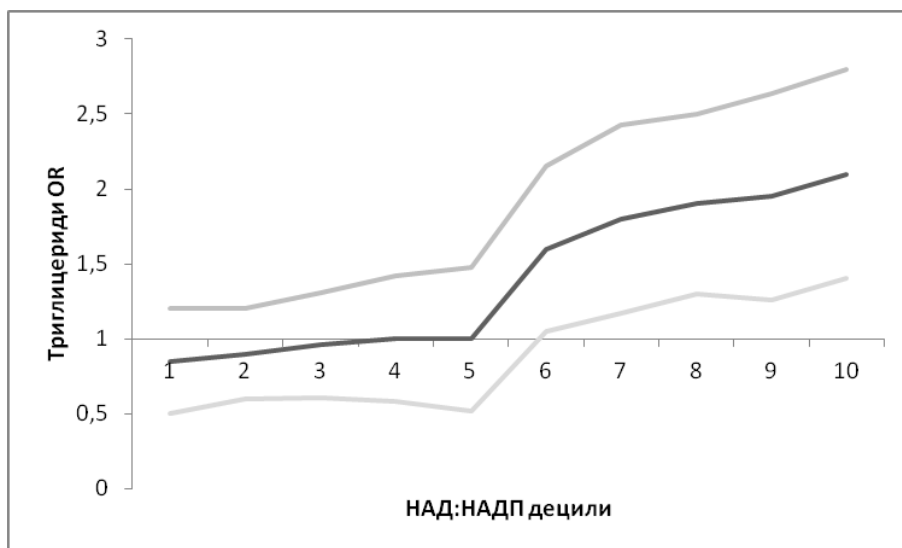
Графикон 8. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност НЕФА у референтним вредностима.



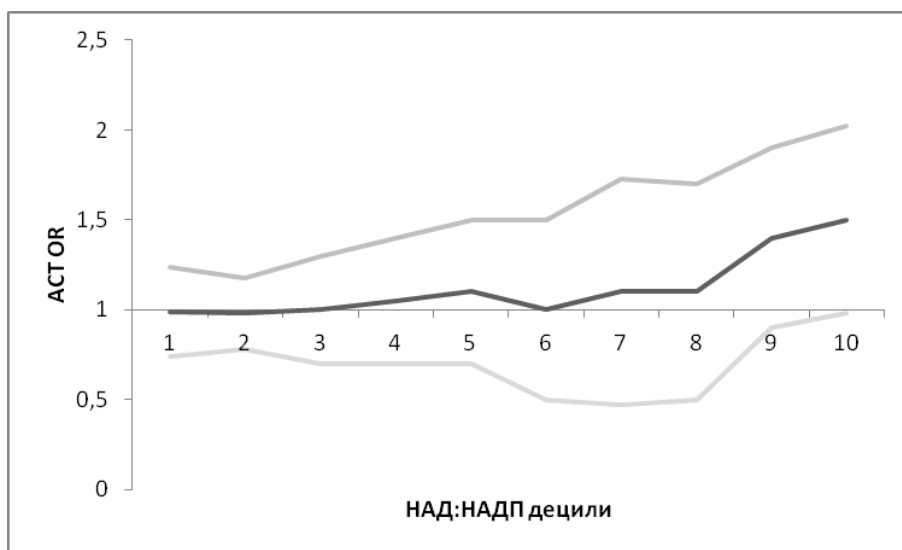
Графикон 9. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност холестерола у референтним вредностима.



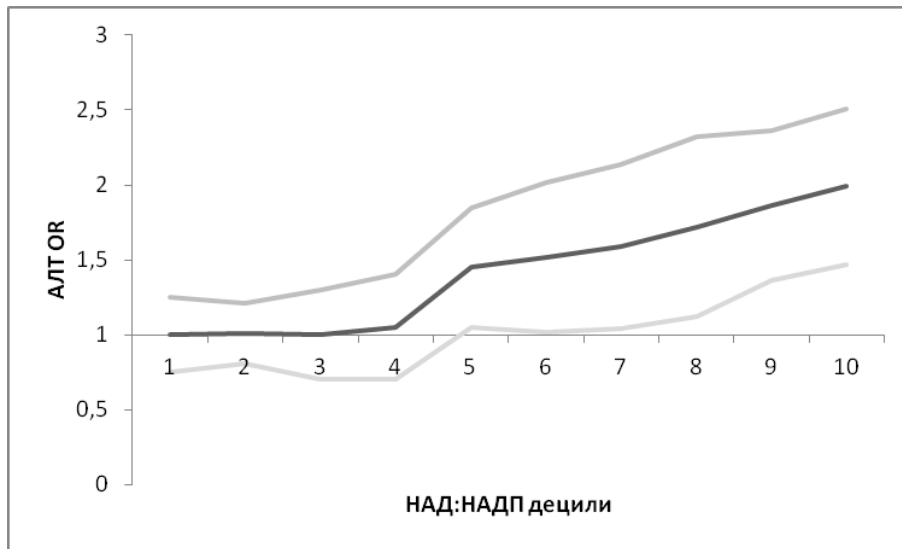
Графикон 10. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност количника НЕФА:холестерол у референтним вредностима.



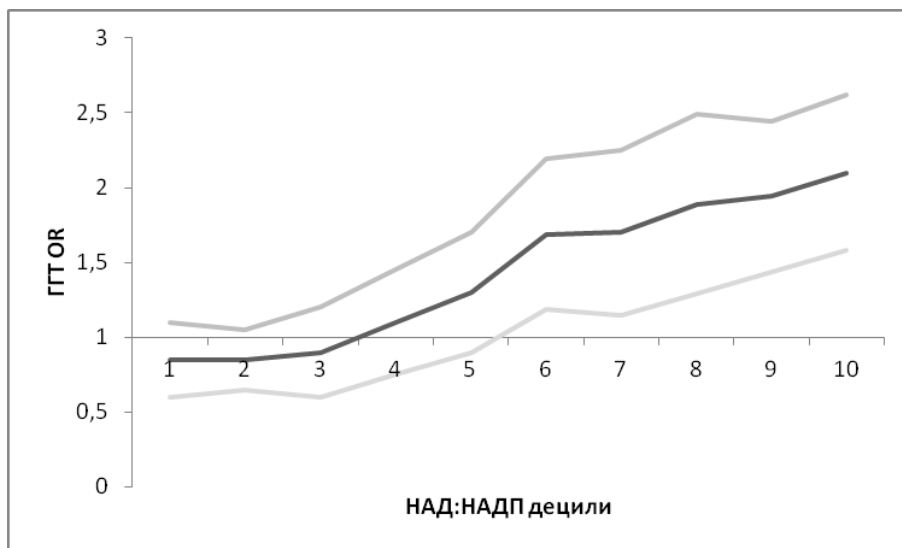
Графикон 11. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност триглицерида у референтним вредностима.



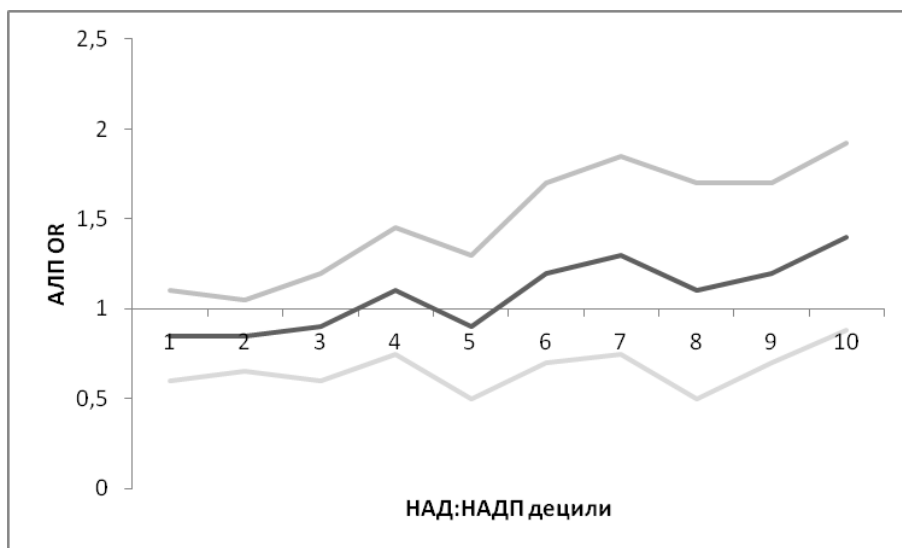
Графикон 12. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност АСТ у референтним вредностима.



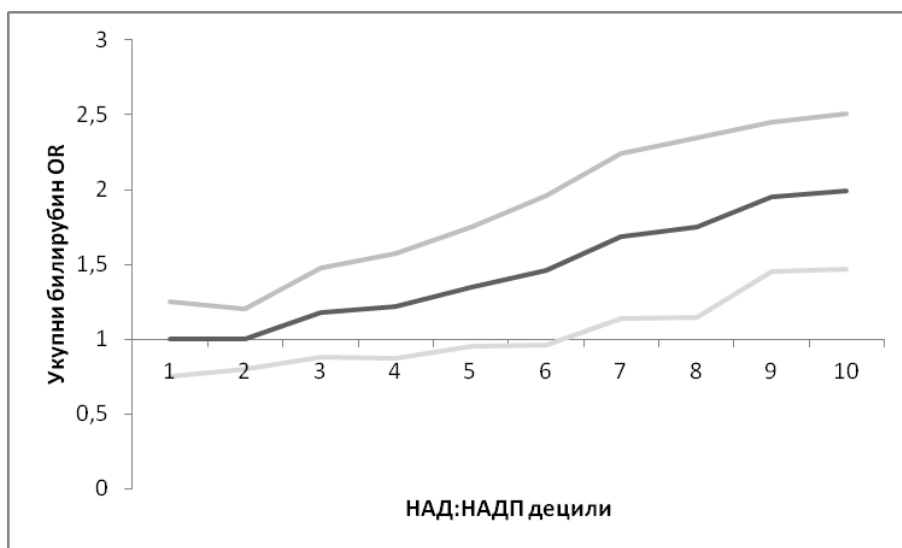
Графикон 13. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност АЛТ у референтним вредностима.



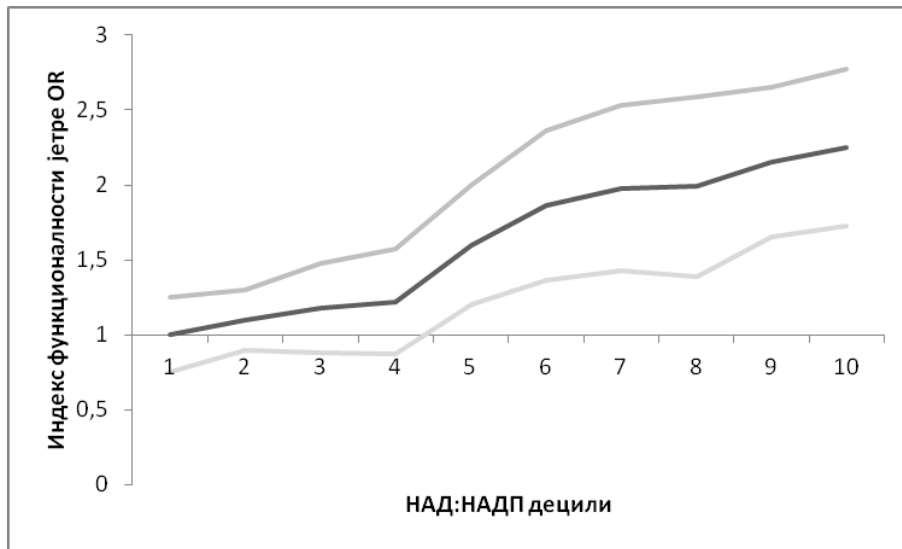
Графикон 14. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност ГТ у референтним вредностима.



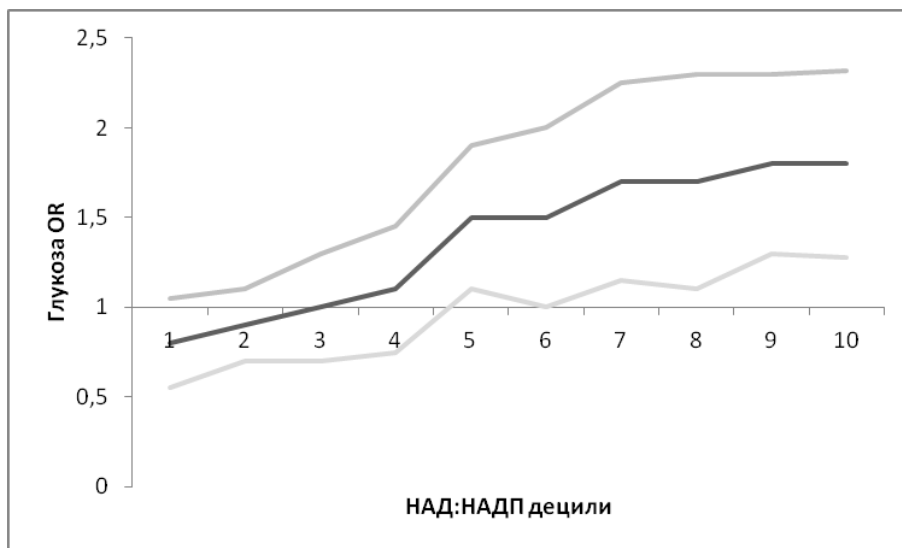
Графикон 15. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност АЛП у референтним вредностима.



Графикон 16. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност укупног билирубина у референтним вредностима.



Графикон 17. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност индекса функционалности јетре у референтним вредностима.



Графикон 18. Повезаност вредности НАД:НАДП индекса ниацинског статуса са вероватноћом да се испољи хепатопротективан утицај ниацина и очува вредност глукозе у референтним вредностима.

## 6. ДИСКУСИЈА

Ниацин се код преживара може уносити у два облика – као слободни (незаштићени) или као заштићени од разградње у бурагу. Незаштићена форма у румену брзо подлеже разградњи и слабо је стабилна, па да би се постигао терапијски ефекат потребне су знатно веће дозе. Заштићени облик (капсулиран у липидној мембрани) пролази кроз бураг готово непромењен и стиже до места апсорпције у танким цревима, чиме се знатно повећава његова биорасположивост (Di Costanzo и сар., 1997).

Због специфичне грађе и функције дигестивног тракта преживара, фармакокинетика лекова који се дају орално – односно апсорпција, расподела, метаболизам и елиминација – знатно се разликује од оне код једногастричних животиња. Разликују се и путеви метаболизма два витамина ниацина, никотинске киселине и никотинамида, који су прекурсори за синтезу НАД-а (DiPalma и Thayer, 1991). Стога се у ветеринарској пракси при примени ниацина код преживара прави разлика између фармакокинетике ова два витамина.

Познато је да микроорганизми румена не само да разграђују већ и синтетишу ниацин. Скроб у оброку подстиче производњу свих витамина Б комплекса, а дневна синтеза ниацина у бурагу достиже више од 2,2 g (Santschi и сар., 2005). Испитивања показују да се већина никотинске киселине и практично сав никотинамид синтетисан у преджелуцима налази у бактеријским ћелијама (Santschi и сар., 2005b). Апсорпција кроз зид румена постоји, али је ограничена, јер се само мали део никотинамида (3–7%) налази растворен у руминалној течности, док је никотинска киселина углавном у јонизованој форми и практично се не апсорбује када је рН нижи од физиолошког (Erikson и сар., 1991). Због те јонизованости биорасположивост слободне никотинске киселине износи тек око 5% (Santschi и сар., 2005). Насупрот томе, заштићени ниацин избегава микробну разградњу и у цревима достиже много већу биорасположивост (Yuan и сар., 2012).

Тип исхране не утиче на апсорпцију у танком цреву (Miller и сар., 1986), где се у дуоденуму ресорбује око 73% никотинске киселине и 94% никотинамида (просечно 84% укупног ниацина) (Santschi и сар., 2005).

Једном апсорбован, ниацин у крвотоку првенствено циркулише везан за еритроците, а затим брзо прелази у јетру, бубреге и масно ткиво, где се метаболише. Јетра има највећу концентрацију ниацина и из триптофана синтетише НАД(П), ослобађајући ниацин за остала ткива. Мишићи, мозак и делимично тестиси могу директно да користе никотинамид без претходне деаминације.

Коензими НАД и НАДП учествују у бројним метаболичким процесима: у анаболизму (синтеза липида и нуклеинских киселина – НАДПХ као редукујући агенс) и у катаболизму (НАД/НАДН). НАД служи и као извор АДП-рибозе за посттранслациону модификацију протеина. Високе дозе никотинске киселине испољавају додатни фармаколошки ефекат – инхибицију липолизе (Tunaru и сар., 2003; Pires и Grummer, 2007). Ензими зависни од НАД и НАДП (нпр. НАД пирофосфатаза, НАД гликохидролаза, АДП-рибозилтрансферазе, поли(АДП-рибоза)полимераза) кључни су у метаболизму угљених хидрата, масти и протеина (Rehage и сар., 1999; Bender, 2003).

У метаболизму липида НАД(П) учествује у синтези и разградњи глицерола, оксидацији и синтези масних киселина и стероида. Код угљених хидрата учествује у гликолизи и Кребсовом циклусу, а у метаболизму протеина у синтези и разградњи аминокиселина.

Код људи је показано да повишен однос НАДН/НАД<sup>+</sup> у јетри настаје током разградње алкохола, што доприноси развоју масне јетре, за коју и даље не постоји ефикасна терапија (Masia и сар., 2018). Никотинска киселина може повећати ниво НАД-а у јетри и крви (Jackson и сар., 1995), а Nara и сар. (2007) показали су да она ефикасније од никотинамида подиже ћелијски НАД. Бројна савремена истраживања указују да концентрација НАД/НАДН има значајну улогу у процесима старења, заштити од апоптозе, настанку канцера, као и код неуродегенеративних и метаболичких болести (Amjad и сар., 2021; Berge и сар.,

2020; Boo, 2021; Guo и сар., 2020; Masia и сар., 2018; Nikas и сар., 2020; Xie и сар., 2020).

Yoshino и сар. (2011) су на моделу мишева показали да гојазност доводи до смањења нивоа НАД<sup>+</sup> у скелетним мишићима, јетри, хипоталамусу и масном ткиву. Инсулинска резистенција, честа последица гојазности, праћена је хроничном инфламацијом ниског интензитета и повећаном синтезом екстрацелуларног матрикса (Yamaguchi и Yoshino, 2017). Ниацин код крава у раној лактацији смањује инсулинску резистенцију и побољшава функцију јетре (Titgemeyer и сар., 2011; Cincović и сар., 2018a; Petrović и Stojanović, 2020). Еритроцитне концентрације НАД и НАДП представљају поуздан показатељ статуса ниацина, јер брже реагују на његов унос; при недовољном уносу ниацина концентрација НАД у крви опада и до 70% за пет недеља, док НАДП остаје готово константан (Fu и сар., 1989).

Транзициони период код високомлечних крава (око телјења) прати појачана мобилизација неестерификованих масних киселина – НЕФА – из адипозног ткива. Оне обезбеђују енергију, али њихово прекомерно повећање може бити токсично. Повишене вредности НЕФА и β-хидроксибутирата (БХБ) у серуму означавају негативан енергетски биланс, уз бројне пратеће метаболичке промене: хипогликемију, снижен холестерол и уреу, повећан билирубин и смањен калцијум (Cincović и сар., 2011; Rafia и сар., 2012).

Никотинска киселина која избегне јетрени метаболизам може се транспортовати до других ткива (Henkes, 1984) и у фармаколошким дозама инхибира липолизу путем ниацинских рецептора (Gille и сар., 2008). Њена примена подиже концентрације НАД и НАДП у крви, што омогућава процену статуса ниацина (Fu и сар., 1989; Jacobson и Jacobson, 1997).

Ђоковић и сар. (2014) нашли су негативну корелацију нивоа НЕФА и БХБ са глукозом у крви, што се објашњава смањеном способношћу јетре за глуконеогенезу када је масно инфилтрирана триглицеридима и кетонима. Иста истраживања показала су позитивну повезаност НАД и НАДП са глукозом и инсулином, док су БХБ и НЕФА у негативној корелацији са овим параметрима. Код кетозних крава концентрација инсулина опада пропорционално порасту

НЕФА. Уочено је и да су триглицериди у серуму значајно нижи код кетозних у односу на здраве краве (Ђоковић и сар., 2013), а њихово смањење приписује се акумулацији масти у јетри. Такође је утврђена негативна веза између НЕФА и триглицерида, као и између НЕФА/БХБ и холестерола, док су НАД и НАДП позитивно повезани са концентрацијом холестерола.

Оштећење јетре доводи до повећања билирубина (Luboјска и сар., 2005), а више аутора бележи позитивну корелацију билирубина са НЕФА и БХБ (Ђоковић и сар., 2012, 2013). Инфилтрација масти у хепатоците изазива лезије и повећава активност ензима као што су АСТ и ГГТ; активност АСТ се сматра најосетљивијим показатељем замашћења јетре код говеда. Према Ђоковићу и сар. (2012), активност АСТ позитивно корелира са садржајем масти у јетри, као и са нивоима НЕФА и БХБ, а негативно са триглицеридима, холестеролом и албумином у серуму. Концентрација албумина у транзиционом периоду код кетозних крава је нижа него код здравих, што се доводи у везу са смањеном јетреном синтезом услед масне инфилтрације. Исти аутори су показали и негативну корелацију БХБ са албумином, а у другом истраживању и негативну везу између НЕФА и албумина, иако без статистичке значајности.

Однос вероватноћа као ефекат третмана леком - Ефекат третмана лека представља централни концепт у клиничкој фармакологији, медицинској статистици и епидемиологији, а означава меру у којој одређени лек утиче на здравље пацијената или животиња у поређењу са одсуством тог лека или са применом неке друге терапије; испитује се у различитим фазама клиничких студија, које су пажљиво дизајниране да покажу како и у којој мери лек испуњава своју сврху, од иницијалних лабораторијских и преклиничких истраживања, преко рандомизованих контролисаних студија на људима или животињама, па све до пост-маркетиншког надзора, и у свакој фази фокус је на јасној квантификацији ефекта третмана кроз поређење третиране и контролне групе; кључна ствар у том процесу јесте да се постави јасно дефинисан исход, односно клинички догађај или промена коју посматрамо (нпр. излечење болести, смањење бола, продужење преживљавања, одсуство компликација, појава нежељених ефеката), затим да се одреди начин поређења између група, што се у статистици остварује помоћу различитих мера ефекта третмана, а међу најчешћима су апсолутне мере (као што

су апсолутна разлика ризика – Absolute Risk Reduction, ARR, или број који треба лечити – Number Needed to Treat, NNT) и релативне мере (као што су релативни ризик – Relative Risk, RR, hazard ratio – HR, и посебно значајан у епидемиологији и логистичкој регресији – однос вероватноћа, Odds Ratio, OR); апсолутне мере дају нам директну и лако разумљиву слику – на пример, ако у контролној групи 20% пацијената обољи, а у третираној 10%, апсолутна редукција ризика је 10%, што значи да на сваких 10 пацијената који приме лек, један ће бити поштеђен болести захваљујући третману, док релативни ризик показује однос тих вероватноћа ( $10\%/20\% = 0,5$ ), што значи да је ризик преполовљен у третираној групи; hazard ratio се често користи у анализама времена до догађаја, као што су преживљавање или време до рецидива болести, и означава релативну стопу догађаја током времена; али у многим случајевима, посебно у студијама типа случај-контрола, где се полази од исхода и испитује претходна изложеност, релативни ризик се не може директно израчунати јер се не зна колика је права инциденција у популацији, и ту се примењује Odds Ratio (OR) – мера која рачуна однос шанси, а шанса или “odds” је сама по себи дефинисана као однос вероватноће да се догађај деси према вероватноћи да се не деси ( $p/(1-p)$ ); дакле, ако је вероватноћа болести 0,2 (20%), онда су шансе  $0,2/0,8 = 0,25$ , док ако је вероватноћа 0,5 (50%), шансе су 1, што значи да је вероватноћа и невероватноћа у равнотежи, а ако је вероватноћа 0,8 (80%), шансе су  $0,8/0,2 = 4$ , односно догађај је четири пута вероватнији да се деси него да се не деси; када се пореде две групе, рецимо експонирана (која прима лек) и неекспонирана (контролна), израчунавамо шансе у обе групе и њихов однос даје Odds Ratio:  $OR = (\text{odds у третираној групи})/(\text{odds у контролној групи})$ , што у пракси можемо израчунати из двоструке контингентне табеле димензија 2x2 у којој су редови групе (третирана и контролна), а колоне исход (догађај присутан или одсутан), па ако означимо бројем а пацијенте у третираној групи код којих се десио догађај, b пацијенте у третираној код којих се није десио, c пацијенте у контролној код којих се десио и d пацијенте у контролној код којих се није десио, формула је  $OR = (a \times d)/(b \times c)$ ; основна интерпретација OR-а је релативно једноставна: ако је  $OR = 1$ , то значи да нема разлике између група, ако је OR већи од 1, догађај је вероватнији у третираној групи, а ако је мањи од 1, догађај је ређи у третираној групи, што се тумачи као заштитни ефекат лека; у клиничкој пракси и истраживањима, OR се увек посматра заједно са поверљивим интервалом (најчешће 95% CI), јер он

показује колико је наша процена прецизна и да ли је ефекат статистички значајан – ако 95% CI обухвата вредност 1, не можемо тврдити да је разлика значајна, док ако интервал лежи потпуно изнад или испод 1, тада имамо доказ о ефекту лека; значај OR-а је посебно изражен у студијама случај-контрола у епидемиологији, где је често једина доступна мера асоцијације, као и у логистичкој регресији, где су коефицијенти модела директно трансформисани у OR и где свака независна промењива има своје “шансе” да повећа или смањи исход; међутим, иако OR има своје предности, његова интерпретација може бити мање интуитивна у поређењу са релативним ризиком, нарочито када су догађаји чести – јер у том случају OR често “пренаглашава” величину ефекта у поређењу са RR, па је важно бити пажљив и увек навести и друге мере када је могуће; у области ветеринарске медицине и млечног говедарства OR се користи да се процени како одређени третман, начин исхране, управљање стадом или ветеринарске интервенције утичу на здравље и производне резултате крава – на пример, у студијама је показано да диференцирана терапија у периоду сушења смањује вероватноћу клиничког маститиса у првим данима лактације (OR = 0,74), што значи да третиране краве имају око 26% мање шансе да обоље у том критичном периоду, док ротација пашњака може додатно смањити шансе на OR = 0,32, односно ризик је три пута мањи него код стандардне праксе; други примери показују како тип објекта или скорa телесне кондиције (Body Condition Score) могу утицати на шансе да крава остане стеона – нпр. краве у објектима са бетонским подом имале су OR = 4,03 за трудноћу у поређењу са онима у слабијим условима, док краве са ниским BCS < 3 имају OR = 0,297, што значи да имају готово 70% мање шансе да затрудне; овакви резултати јасно показују како OR пружа практичну, бројчану и лако преносиву информацију за ветеринаре и фармере о ефектима третмана и менаџмента, а исти принцип примењује се и у хуманој медицини, где се, рецимо, процењује ефекат статина на појаву постоперативне фибрилације атрија (OR = 0,41), што указује на значајан заштитни ефекат; укупно гледано, испити ефекта лека почиње од дефиниције исхода, прикупљања података и формирања контролних и третираних група, затим се прелази на избор статистичке мере – релативни ризик, hazard ratio или odds ratio – а интерпретација резултата мора бити контекстуализована, уз проверу статистичке значајности и поверљивих интервала, као и практичне клиничке важности; на тај начин се научни докази преводе у клиничке одлуке, било у хуманој или ветеринарској медицини, а OR остаје неизоставна и често

коришћена мера, посебно у ситуацијама када су друге мере тешко доступне, када је исход редак или када користимо регресионе моделе, па можемо закључити да разумевање OR-а и његових ограничења представља кључни део интерпретације ефекта третмана лека и да доприноси доношењу исправних терапијских одлука и унапређењу здравља пацијената и животиња. До сада смо причали уопштено:  $OR < 1$  обично указује на заштитни ефекат (мање шанси за лош исход), док  $OR > 1$  значи повећан ризик (више шанси за лош исход). Међутим, значење OR зависи од тога како је дефинисан исход у студији. Ако је исход нежељени догађај, као што су маститис, смрт или компликација,  $OR < 1$  показује да лек смањује шансе за нежељени исход и самим тим има заштитни ефекат, док  $OR > 1$  значи да лек повећава ризик и може бити штетан. С друге стране, ако је исход повољан догађај, на пример излечење, стеоност или клиничко побољшање,  $OR > 1$  означава да лек повећава шансе за повољан исход, док  $OR < 1$  сугерише да лек смањује шансе за успех и може бити мање ефикасан. Дакле, тумачење OR зависи од тога шта се сматра „догађајем”:  $OR > 1$  је позитиван ефекат лека када се мери побољшање или излечење, али негативан ефекат када се мери ризик од нежељених последица. У табlici је приказано како се исти OR различито тумачи у зависности од типа исхода:  $OR = 1$  значи да лек нема ефекта;  $OR < 1$  смањује ризик од негативног исхода или смањује шансе за позитиван исход;  $OR > 1$  повећава шансе за позитиван исход или повећава ризик од негативног исхода. Укратко, за позитиван исход  $OR > 1$  значи користан ефекат, а  $OR < 1$  мање шанси за успех, док за негативан исход  $OR > 1$  значи повећан ризик, а  $OR < 1$  заштитни ефекат. Ми смо у нашем раду дефинисали  $OR > 1$  значи користан ефекат.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата спроведеног истраживања може се закључити следеће:

- 1) Ниацин показује хепатопротективну улогу јер помаже јетри у очувању секреторног капацитета што се види кроз вредности албумина и глукозе
- 2) Ниацин показује хепатопротективну улогу јер доводи до опадања липолизе, кетогенезе и акумулације масти у јетри, што се огледа кроз смањење вредности НЕФА, БХБ, пораст вредности холестерола и триглицерида и повољнији однос НЕФА:холестерол.
- 3) Ниацин смањује оптерећење и некрозу хепатоцита и оптерећење жучних путева јер доводи до опадања активности јетриних ензима и концентрације билирбина
- 4) Ниацински статус који се огледа у НАД:НАДП индексу значајно указује на хепатопротективну функцију ниацина, тако да са порастом овог индекса постоји много већа шанса да се велики број биохемијских параметара нађе у оквиру референтне вредности него да њихове вредности буду неповољне односно изван референтне вредности
- 5) На основу разлике у вредности метаболита која се добија приликом апликације ниацина и односа вероватноћа да се метаболички параметри нађу у оквиру референтних вредности приликом бољег ниацинског индекса закључујемо да апликација ниацина код крава у перипарталном периоду показује хепатопротективну улогу.
- 6) Однос вероватноћа је добар и једноставан показатељ ефекта третмана ниацином код крава у раној лактацији.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

- Amjad, S., Nisar, S., Bhat, A. A., Frenneaux, M. P., Fakhro, K., Haris, M., ... & Bagga, P. Role of NAD<sup>+</sup> in regulating cellular and metabolic signaling pathways. *Molecular Metabolism*, 101195, 2021.
- Baldwin R. L., Yang Y. T, Crist K., Grichting.G.: Theoretical model of ruminant adipose tissue metabolism in relation to the whole animal. *Fed. Proc.* 35:2314-2318, 1976.
- Beerda B., Kornalijnslijper J.E., van der Werf J.T.N., Noordhuizen-Stassen E.N., Hopster H.: Effects of Milk Production Capacity and Metabolic Status on HPA Function in Early Postpartum Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 87: 2094–2102, 2004.
- Belić B, Cincović MR, Stevančević M, Toholj B. Parameters of negative energy balance (NEFA, BHB and glucose) and neutrophil to lymphocyte ratio in cows after calving – comparison of two indicators of stress. 12th Middle European Buiatric Congress, Pula, Croatia, May 18-22, 281-284, 2011.
- Bell A., Bauman D.: Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2(3): 265-278, 1997.
- Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, 73:2804–2819, 1995.
- Bender DA. Niacin. In: *Nutritional biochemistry of the vitamins*. 2ed ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
- Berge, R. K., Cacabelos, D., Señaris, R., Nordrehaug, J. E., Nygård, O., Skorve, J., & Bjørndal, B. Hepatic steatosis induced in C57BL/6 mice by a non- $\beta$  oxidizable fatty acid analogue is associated with reduced plasma kynurenine metabolites and a modified hepatic NAD<sup>+</sup>/NADH ratio. *Lipids in health and disease*, 19(1), 94, 2020.
- Bhasker CR, Friedmann T. Insulin-like growth factor-1 coordinately induces the expression of fatty acid and cholesterol biosynthetic genes in murine C2C12 myoblasts. *BMC Genom*, 9:535, 2008.

- Bird, J. G. et al. The mechanism of RNA 5' capping with NAD<sup>+</sup>, NADH and desphospho-CoA. *Nature* 535, 444–447, 2016.
- Bitman J, Wood DL. Changes in milk fat phospholipids during lactation. *J Dairy Sci*, 73:1208–1216, 1990.
- Bjerre-Harpoth V., Friggens N.C., Thorup V.M., Larsen T., Damgaard B.M., Ingvarsten K.L., Moyes K.M.: Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *J.Dairy Sci*, 95(5): 2362-2380, 2012.
- Bobe G, Young JW, Beitz DC. Invited Review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci*, 87:3105–3124, 2004.
- Boo, Y.C. Mechanistic Basis and Clinical Evidence for the Applications of Nicotinamide (Niacinamide) to Control Skin Aging and Pigmentation. *Antioxidants*. 10, 1315, 2021.
- Boyonoski AC, Spronck JC, Jacobs RM, Shah GM, Poirier GG, Kirkland JK. Pharmacological intakes of niacin increase bone marrow poly(ADP-ribose) and the latency of ethylnitrosourea-induced carcinogenesis in rats. *J Nutr* 132: 115-20, 2002.
- Cant JP, Trout DR, Qiao F, Purdie NG. Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. *J Dairy Sci*, 85:494–503, 2002.
- Carlson LA. Nicotinic acid: The broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med*, 258:94-114, 2005.
- Carlson LA. Studies on the effect of nicotinic acid on catecholamine stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro. *Acta Med Scand*, 173:719–722, 1963.
- Chen, S. H. & Yu, X. Human DNA ligase IV is able to use NAD<sup>+</sup> as an alternative adenylation donor for DNA ends ligation. *Nucleic Acids Res.* 47, 1321–1334, 2019.
- Cincović M., Hristovska T., Belić B.: Niacin, Metabolic Stress and Insulin Resistance in Dairy Cows. In, B group vitamins current uses and perspectives. 107-125, IntechOpen, London United Kingdom, 2018a.
- Cincović M.R., Belić B., Vidović B., Krčmar Lj.: Reference values and frequency distribution of metabolic parameters in cows during lactation and in pregnancy. *Contemporary agriculture*. 60:175-182, 2011.

- Cincović MR, Belić B, Stevančević M, Lako B, Toholj B, Potkonjak A. Diurnal variation of blood metabolite in dairy cows during heat stress. *Contemp Agric*, 59(3-4):300-305, 2010.
- Cincović MR, Đoković R, Belić B, Lakić I, Stojanac N, Stevančević O, Staničkov N. Insulin resistance in cows during the periparturient period. *Acta Agric Serb*, 23(46): 233-245, 2018.
- Collard BL, Boettcher PJ, Dekkers JCM, Peticlerc D, Schaeffer LR. Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *J Dairy Sci*, 83:2683–2690, 2000.
- Demarest T.G., Babbar M., Okur M.N., Dan X., Croteau D.L., Fakouri N.B. NAD<sup>+</sup> metabolism in aging and cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. 3(1):105–130, 2019.
- Desvergne B, Michalik L, and Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev*, 86:465–514, 2006.
- Di Costanzo A, Spain JN, Spiers D. Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. *J Dairy Sci*, 80:1200–1206, 1997.
- Di Palma JR, Thayer WS. Use of niacin as a drug. *Annu Rev Nutr*, 11:169, 1991.
- Đoković R, Cincović M, Kurćubić V, Petrović M, Lalović M, Jašović B, Stanimirović Z. Endocrine and Metabolic Status of Dairy Cows during Transition Period. *Thai J Vet Med*, 44(1):59-66, 2014.
- Đoković R. D., Kurćubić V., Ilić, Z., Cincovic M., Fratric N, Petrović M., Jašović B. Evaluation of metabolic status in Simmental dairy cows during late pregnancy and early lactation. *Veterinarski arhiv Zagreb*. 6 (83): 593-502, 2013.
- Đoković R., Šamanc H., Nikolić Z., Bošković-Bogosavljević S.: Changes in blood values of glucose, insulin and inorganic phosphorus in healthy and ketotic cows after intravenous infusion of propionate solution. *Acta Veterinaria Brno*, 76:533-539, 2007.
- Đoković R.D, Šamanc H., Petrović M. D., Ilić Z., Kurćubić V. Relationship among blood metabolites and lipid content in the liver in transitional dairy cows. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 28 (4):705-714, 2012.
- Đoković R.D., Cincović M.R., Belić B.M.: Fiziologija i patofiziologija metabolizma krava u peripartalnom period. Novi Sad, 2014.
- Đoković RD. Endokrini status mlečnih krava u peripartalnom periodu. *Agronomski fakultet, Čačak*, 2010.

- Doreau M., Ottou J.F.: Influence of niacin supplementation on in vivo digestibility and ruminal digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79(12):2247-2254, 1996.
- Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final Frontier. *J Dairy Sci* 82:2259–2273, 1999.
- Drackley JK. Lipid metabolism. In: D'Mello JPF (Ed) *Farm animal metabolism and nutrition*. CAB International, New York, pp. 97–119, 2000.
- Duehlmeier R, Sammet K, Widdel A, von Engelhardt W, Wernery U, Kinne J, Sallmann HP. Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comp Biochem Physiol* 146:274–282, 2007.
- Ehrhardt RA, Bell AW. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 273:1132-41, 1997.
- Emery RS, Liesman JS, Herdt TH. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver, *J Nutr.* 122: 832-837, 1992.
- Erikson PS, Murphy MR, McSweeney CS, Trusk AM. Niacin absorption from the rumen. *J Dairy Sci*, 74:1078, 1991.
- Friggens NC, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard IR, Ingvarsen KL, Løvendahl PL, Jensen J. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence for genetically driven body reserve change. *J Dairy Sci* 90:5291–5305, 2007.
- Fu C.S., Swendseid M.E., Jacob R.A., McKee R.W.: Biochemical markers for assessment of niacin status in young men: levels of erythrocyte niacin coenzymes and plasma tryptophan. *J. Nutr.* 119:1949–55, 1989.
- Fu CS, Swendseid ME, Jacob RA, McKee RW. Biochemical markers for assessment of niacin status in young men: levels of erythrocyte niacin coenzymes and plasma tryptophan. *J Nutr.* 119:1949–55, 1989.
- Fulco M., Schiltz R. L., Iezzi S., King M. T., Zhao P., Kashiwaya Y., Hoffman E., Veech R. L., Sartorelli V.: Sir2 Regulates Skeletal Muscle Differentiation as a Potential Sensor of the Redox State. *Mol. Cell.* 12:51–62, 2003.
- Gašić O, Popović M, Đurković R. *Biohemija domaćih životinja*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad;1998.

- Gille A, Bodor ET, Ahmed K, Offermanns S. Nicotic acid: Pharmacological effects and mechanisms of action. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 48:79-106, 2008.
- Goff JP, Horst RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sc*, i 80:1260–1268, 1997.
- Goof J.P.: Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology* 126: 237–257, 2006
- Greenfield R.B., Cecava M.J., Donkin S.S.: Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J. Dairy Sci.*, 83: 1228-1236, 2002.
- Gross J, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *J Dairy Sci*, 94:1820-1830, 2011.
- Gross JJ, Schwarz FJ, Eder K, van Dorland HA, Bruckmaier RM. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J Dairy Sci*, 96:5008–5017, 2013.
- Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20:447–470, 2004.
- Grummer RR, Wiltbank MC, Fricke PM, Watters RD, Silva-Del-Rio N. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev* 56 Suppl: S22–28, 2010.
- Grummer RR. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 76:3882–3896, 1993.
- Grummer RR. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J*, 176:10–20, 2008.
- Guo, W.; Liu, J.; Li, W.; Ma, H.; Gong, Q.; Kan, X.; Cao, Y.; Wang, J.; Fu, S. Niacin Alleviates Dairy Cow Mastitis by Regulating the GPR109A/AMPK/NRF2 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3321, 2020.
- Hankes L.V.: Nicotinic acid and nicotinamide. In *Handbook of Vitamines, Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects*. L.J Machined, ed. New York: Marcel Dekker. p.329-377, 1984.

- Hankes L.V.: Nicotinic acid and nicotinamide. In Handbook of Vitamines, Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. L.J Machined, ed. New Jork: Marcel Dekker. p.329-377, 1984.
- Hara N., Yamada K., Shibata T., Osago H., Hashimoto T., Tsuchiya M.: Elevation of Cellular NAD Levels by Nicotinic Acid and Involvement of Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 28:,24574-24582, 2007.
- Hayirli A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun*, 30:749–774, 2006.
- Henderson LM. Niacin. *Annu Rev Nutr*, 3:289-307, 1983.
- Herzog K. Versuche zur pankreatischen Insulin-Response von trockenstehenden und laktierenden Kühen sowie Kühen mit Leberverfettung mittels intravenösem Glucosetoleranztest und hyperglykämischer Clamp-Technik. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. Med. Vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover, 2001
- Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest*, 101:2331–2339, 1998.
- Hristovska T., Cincović M., Stojanović D., Belić B., Kovačević Z., Jezdimirović M.: Influence of Niacin Supplementation on the Metabolic Parameters and Lipolysis in Dairy Cows During Early Lactation: *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 23 (5):773-778, 2017.
- Hristovska, T., Cincović, M., Belić, B., Stojanović, D., Jezdimirović, M., DJOKOVIĆ, R., & Toholj, B. Effects of niacin supplementation on the insulin resistance in Holstein cows during early lactation. *Acta Veterinaria Brno*, 86, 231-238, 2017.
- Ingvartsen KL, Andersen HR. Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals. *J Dairy Sci*, 83:1573-1597, 2000.
- Ivanov I, Šamanc H, Vujanac I, Dimitrijević B. Metabolički profil krava, u: Zbornik radova 4. Simpozijuma Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda - Etiopatogeneza i dijagnostika poremećaja metabolizma reprodukcije goveda. Subotica, 241-247., 2005.

- Jackson T.M., Rawling J.M., Roebuck B.D., Kirkland J.B.: Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD<sup>+</sup> and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats. *J. Nutr.* 125:1455-1461, 1995.
- Jacobson E.L., Jacobson M.K.: Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans. *Methods Enzymol.* 280:221–230, 1997.
- Jacobson EL, Jacobson MK. Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans. *Methods Enzymol.* 280:221–30, 1997.
- Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci* 94:1385–1400, 2011.
- Johnson CA. Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology* 70:1418–1423, 2008.
- Jokinen, R., Pirnes-Karhu, S., Pietiläinen, K. H., & Pirinen, E. Adipose tissue NAD<sup>+</sup>-homeostasis, sirtuins and poly (ADP-ribose) polymerases-important players in mitochondrial metabolism and metabolic health. *Redox biology.* 12, 246-263, 2017.
- Kamat J.P., Devasagayam T.P. Methylene blue plus light-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: Inhibition by nicotinamide (vitamin B3) and other antioxidants. *Chem. Biol. Interact.* 99:1–16. doi: 10.1016/0009-2797(95)03653-9, 1996.
- Kamat J.P., Devasagayam T.P.A. Nicotinamide (vitamin B-3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria. *Redox Rep.* 4:179–184. doi: 10.1179/135100099101534882, 1999.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. (Eds.) *Clinical biochemistry of Domestic Animals.* London: Academic Press Limited. 356–358, 883–895, 2008.
- Kenéz A., Locher L., Rehage J., Dänicke S., Huber K.: Agonists of the G protein-coupled receptor 109A-mediated pathway promote antilipolysis by reducing serine residue 563 phosphorylation of hormone-sensitive lipase in bovine adipose tissue explants. *J. Dairy Sci.* 97:3626–3634, 2014.
- Kokkonen T, Taponen J, Anttila T, Syrjälä-Qvist L, Delavaud C, Chilliard Y, Tuori M, Tesfa AT. Effect of body fatness and glucogenic supplement on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *J Dairy Sci*, 88:1127–1141, 2005.

- Komatsu T., Itoh F., Mikawa S., Hodate K.: Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *J. Anim. Sci.*, 83: 557–564, 2005.
- Long CA, Patton S, McCarthy RD. Origins of the cholesterol in milk. *Lipids*, 15:853–857, 1980.
- Loor JJ, Everts RE, Bionaz M, Dann HM, Morin DE, Oliveira R, Rodriguez-Zas SL, Drackley JK, Lewin HA. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics*, 32:105–116, 2007.
- Masia, R., McCarty, W. J., Lahmann, C., Luther, J., Chung, R. T., Yarmush, M. L., & Yellen, G. Live cell imaging of cytosolic NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in hepatocytes and liver slices. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(1), G97-G108, 2018.
- McHugh, M. L. The odds ratio: calculation, usage, and interpretation. *Biochemia medica* 2009, 19(2), 120-126.
- McReynolds M.R., Chellappa K., Baur J.A. Age-related NAD(+) decline. *Experimental Gerontology*. 134:110888, 2020.
- Miller B.L., Meiske J.C., Goodrich R.D.: Effects of grain source and concentrate level on B-vitamin production and absorption in steers. *J. Anim. Sci.* 62:473-483, 1986.
- Morey SD, Mamedova LK, Anderson DE, Armendariz CK, Titgemeyer EC, Bradford BJ. Effects of encapsulated niacin on metabolism and production of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 94:5090-5104, 2011.
- Muoio DM. Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta*. 1801(3):281–288, 2010.
- Ness GC, Zhao Z, Wiggins L. Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels. *J Biol Chem*, 269:29168–29172, 1994.
- Niehoff ID, Hüther L, Lebzien P, Flachowsk G. The effect of a Niacin supplementation to different diets on ruminal fermentation and flow of nutrients to the duodenum of dairy cows. *Appl Agric Forestry Res*, 63(2):143-154, 2013.
- Nikas, I.P.; Paschou, S.A.; Ryu, H.S. The Role of Nicotinamide in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Biomolecules*. 10, 477, 2020.

- Nikolić JA, Kulcsár M, Kátai L, Nedić O, Jánosi S, Huszenicza G. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 50:22–29, 2003.
- Niren N.M. Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: A review. *Cutis*. 77:11–16, 2006.
- NRC: Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Seventh revised edition. National Academy Press Washington, D.C., USA. 2001.
- O’Neil M.J.: The Merck Index- An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological. Whitehouse Station, NJ:Merck and Co., Inc., p.1129, 2006.
- Offermanns S.: The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends. Pharmacol. Sci.* 27 (7):384-390, 2006.
- Overton TR, Waldron MR. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci* 87:(E.Suppl.):E105–E119, 2004.
- Pehar M., Harlan B.A., Killoy K.M., Vargas M.R. Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism and neurodegeneration. *Antioxidants and Redox Signaling*. 28(18):1652–1668, 2018.
- Pere MC, Etienne M, Dourmad JY. Adaptations of glucose metabolism in multiparous sows: effects of pregnancy and feeding level. *J Anim Sci* 78:2933–2941, 2000.
- Petrović K, Stojanović D, Hristovska T, Štrbac F. Uticaj aplikacije niacina na razvoj inflamacije i metabolizam holesterola kod krava u ranoj laktaciji. *Zdravstvena zaštita i reprodukcija životinja*, Novi Sad, Srbija, 17-23. oktobar; (onlajn-vebinar), 105-110, 2020.
- Petrović K, Stojanović D. Uticaj anti-inflamatornog efekta niacina na enzime jetre i oksidativni stres krava u ranoj laktaciji. *Veterinarski Pregled*. 1(1):105-111, 2020.
- Petrović, K.; Cincović, M.R.; Belić, B.; Đoković, R.; Lakić, I.; Stojanović, D. Influence of niacin application on inflammatory parameters, non-esterified fatty acids and functional status of liver in cows during early lactation. *Large Anim. Rev.* 27, 17–21, 2021.
- Petterson JA, Dunshea FR, Ehrhardt RA, Bell AW. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. *J Nutr*, 123:1286–1295, 1993.
- Petterson JA, Slepetic R, Ehrhardt RA, Dunshea FR, Bell AW. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates suppression of fat mobilization in sheep. *J Nutr*, 124:2431–2436, 1994.

- Pillai J. B., Isbatan A., Imai S., Gupta M. P.: Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-dependent Cardiac Myocyte Cell Death during Heart Failure Is Mediated by NAD<sup>+</sup> Depletion and Reduced Sir2 $\alpha$  Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* 280:43121–4313, 2005.
- Pires JAA, Grummer RR. The use of nicotinic acid to induce sustained low plasma nonesterified fatty acids in feed-restricted Holstein cows. *J Dairy Sci*, 90:3725–3732, 2007.
- Pires JAA, Pescara JB, Grummer RR. Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows. *J Dairy Sci*, 90:4635–4642, 2007.
- Popović M.: Biohemija životinja. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2008.
- Rafia S., Taghipour-Bazargani T., Khaki Z., Bokaie S., Sattari Tabrizi S.: Effect of body condition score on dynamics of hemogram in periparturient Holstein cows. *Comp. Clinical. Pathol.* 21:933-943, 2012.
- Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G, Pownall HJ. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry*, 36:3645–3653, 1997.
- Rehage J., Qualmann K., Meier C., Stockhofe-Zurwieden N., Hoeltershinken M., Pohlenz J.: Total serum bile acid concentrations in dairy cows with fatty liver and liver failure. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 106:126–129, 1999.
- Revollo J.R, Grimm A.A, Imai S.: The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279:50754–50763, 2004.
- Reynolds C.K., Huntington G.B., Tyrrell H.F., Reynolds P.J.: Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 71: 1803–1812, 1998.
- Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J Dairy Sci*, 86:1201–1217, 2003.
- Riddell DO, Bartley EE, Dayton AD. Effect of nicotinic acid on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J Dairy Sci*, 63(9):1429-1436, 1980.
- Šamanc H.A.: Bolesti organa za varenje goveda. Beograd, 2009.

- Samanta A.K., Kewalramani N., Kaur H.: Effect of niacin supplementation on VFA production and microbial protein synthesis in cattle. *Indian J. Dairy Sci.* 53(2):150-153, 2000.
- Santschi DE, Barthiaume R, Matte JJ, Mustafa AF, Girard CL. Fate of supplementary B-vitamins in gastrointestinal tract of dairy cows. *J Dairy Sci*, 88:2043-2054, 2005b.
- Santschi DE, Chiquette J, Berthiaume R, Martineau R, Matte JJ, Mustafa AF, Giard CL. Effects of the forage to concentrate ratio on B-vitamin concentrations in different ruminal fractions of dairy cows. *Can J Anim Sci*, 85:385-399, 2005.
- Sauve A.A.: NAD<sup>+</sup> and Vitamin B3 : From metabolism to therapies. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 324(3):883-893, 2008.
- Seyedsadjadi, N., Berg, J., Bilgin, A. A., Braid, N., Salonikas, C., & Grant, R. High protein intake is associated with low plasma NAD<sup>+</sup> levels in a healthy human cohort. *PloS one*, 13(8), e0201968, 2018.
- Snidr V.A., Damian D.L., Halliday G.M. Nicotinamide for photoprotection and skin cancer chemoprevention: A review of efficacy and safety. *Exp. Dermatol.* 28(Suppl 1):15–22. doi: 10.1111/exd.13819, 2019.
- Song S.B., Jang S.-Y., Kang H.T., Wei B., Jeoun U.-W., Yoon G.S., Hwang E.S. Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy. *Mol. Cells.* 40:503–514, 2017.
- Song S.B., Park J.S., Chung G.J., Lee I.H., Hwang E.S. Diverse therapeutic efficacies and more diverse mechanisms of nicotinamide. *Metabolomics.* 15:137. doi: 10.1007/s11306-019-1604-4, 2019.
- Srikantia S. G., Narasinga Rao B. S., Raghuramulu N. Gopala C.: Pattern of nicotinamide nucleotides in the erythrocytes of pellagrins. *Am. J. Clin. Nutr.* 21:1306-1309, 1968.
- Stefan N, Stumvoll M, Bogardus C, Tataranni PA. Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(6):1156-1161, 2003.
- Stein J., Daniel H., Whang E., Wenel U., Hahn A., Rehner G.: Rapid postabsorptive metabolism of nicotinic acid in rat small intestine may affect transport by metabolic trapping. *J. Nutr.* 124:61–66, 1994.

- Taggart AK, Kero J, Gan X, Cai TQ, Cheng K, Ippolito M, Ren N, Kaplan R, Wu K, Wu T, J, Jin L, Liaw C, Chen R, Richman J, Connolly D, Offermanns S, Wright SD, Waters MG. d- $\beta$ -Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem*, 280:26649–26652, 2005.
- Tall AR, Krumholz S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ. Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res*, 26:842–851, 1985.
- Titgemeyer E, Spivey K, Mamedova L, Bradford B. Effects of pharmacological amounts of nicotinic acid on lipolysis and feed intake in cattle. *Int J Dairy Sci*, 6:134–141, 2011.
- Titgemeyer E.C., Mamedova L.K., Spivey K.S., Farney J.K., Bradford B.J.: An unusual distribution of the niacin receptor in cattle. *J. Dairy Sci.* 94 :4962–4967, 2011a.
- Trevisi, E., Minuti, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in veterinary science* 2018, 116, 47-54.
- Trevisi, E., Minuti, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in veterinary science*, 116, 47-54, 2018.
- Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, Offermanns S. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med*, 9:352–355, 2003.
- Van Saun R.J. Metabolic Profiling and Health Risk in Transition Cows. In: *Proceedings 37th Annual American Association of Bovine Practitioners Convention*. Ft. Worth, Texas, September 23-25, 212-213, 2004b.
- Van Saun R.J.: Assessing Nutritional and Health Status of Transition Cows. 8 pp., In: *Proceedings Mid-Atlantic States Conference for Bovine Practitioners*, Frederick, Maryland, March 25-26, 2004.
- Van Saun R.J.: Metabolic Profiling: Assessing nutritional status of the transition cow. *Washington State VMA Annual Scientific Proceedings*, str.1-8, 2000.
- Vaughan, AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res*, 47:2433–2443, 2006.
- Vázquez-Meza, H., de Piña, M. Z., Pardo, J. P., Riveros-Rosas, H., Villalobos-Molina, R., & Piña, E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs activate NADPH oxidase

- in adipocytes and raise the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pool to prevent cAMP-stimulated protein kinase a activation and inhibit lipolysis. *BMC biochemistry*, 14(1), 13, 2013.
- Virag L., Szabo C.: The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 54:375–429, 2002.
- Weiss W.P., Gonzalo F.: Are your cows getting the vitamin they need? *J. WCDS advances in Dairy Technology.* 18:249-259, 2006.
- Xie N., Zhang L., Gao W., Huang C., Huber P.E., Zhou X. NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 5(1):227, 2020.
- Yalkowsky S.H., Yan H.: Handbook of aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL dATABASE. CRC press LLC, Boca Raton, FL. p.228, 2003.
- Yamaguchi, S. & Yoshino, J. Adipose tissue NAD(+) biology in obesity and insulin resistance: From mechanism to therapy. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 39, <https://doi.org/10.1002/bies.201600227>, 2017.
- Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. & Imai, S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14, 528–536, 2011.
- Yuan K, Shaver RD, Bertics SJ, Espineira M, Grummer RR. Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress, and performance of transition dairy cows. *J Dair Sci*, 95:2673-2679, 2012.
- Zhang H., Ryu D., Wu Y., Gariani K., Wang X., Luan P. NAD<sup>+</sup> repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science.* 352(6292):1436–1443, 2016.
- Zhao FQ, Moseley WM, Tucker HA, Kennelly JJ. Regulation of glucose transporter gene expression in mammary gland, muscle, and fat of lactating cows by administration of bovine growth hormone and bovine growth hormone-releasing factor. *J Anim Sci* 74:183–189, 2006.
- Zurek E, Foxcroft GR, Kennelly JJ. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*, 78:1909–1920, 1995.