



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET NOVI SAD
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**UTICAJ NIACINA NA LIPIDNI PROFIL I METABOLIČKU
ADAPTACIJU KRAVA U RANOJ LAKTACIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Doc.dr Marko Cincović

Prof.dr Dragica Stojanović

Kandidat:

Talija Hristovska

Novi Sad, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	4
2. PREGLED LITERATURE.....	6
2.1 Metaboličke promene u peripartalnom periodu kod krava sa posebnim aspektom na metabolizam lipida	6
2.1.1 Negativan energetska bilans	7
2.1.2 Metabolizam lipida u peripartalnom periodu	9
2.2 Faktori koji utiču na lipidnu mobilizaciju i ketogenezu kod krava u peripartalnom periodu.	15
2.2.1 Uticaj genetske predispozicije na lipidnu mobilizaciju.....	15
2.2.2 Uticaj telesne kondicije na lipidnu mobilizaciju	16
2.2.3 Uticaj hormonskih promena na lipidnu mobilizaciju.....	17
2.2.4 Insulinska rezistencija i transport glukoze	20
2.3 Uticaj lipidne mobilizacije i ketogeneze na metaboličke parametre.....	22
2.3.1. Uticaj NEFA u nastanku insulinske rezistencije	22
2.3.2 Uticaj NEFA na glukoneogenezu	23
2.3.3 Uticaj NEFA na metabolizam masnih kiselina i triglicerida.....	24
2.3.4 Uticaj lipolize i ketogeneze na metaboličke parametre u krvi	25
2.4 Adaptacija adipocita i hepatocita na peripartalni period.....	27
2.4.1 Adaptacija adipocita.....	28
2.4.2 Adaptacija hepatocita.....	29
2.5 Farmakokinetika i farmakodinamika niacina kod preživara	31
2.5.1 Fizička i hemijska svojstva niacina.....	31
2.5.2 Forme niacina.....	33
2.5.3 Absorbicija i distribucija niacina	34
2.5.4 Sinteza, metabolizam i eliminacija nikotinamid nulkeotid koenzima.....	37
2.6 Uticaj aplikacije niacina na metaboličke parametre kod krava u ranoj laktaciji.....	40
2.7 Efekti niacina na laktacione performanse	45
3. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	47

4. MATERIJAL I METODE	48
5. REZULTATI	53
5.1 Uticaj aplikacije niacina na vrednost njegovih vitamina u krvi	53
5.2 Uticaj aplikacije niacina na lipidni profil krava, glukoze, insulin i indekse insulinske rezistencije	61
5.3 Uticaj aplikacije niacina na vrednost ostalih metaboličkih parametara	79
5.4 Uticaj aplikacije niacina na povezanost metaboličkih parametara sa stepenom lipolize i ketogeneze	94
5.5 Uticaj aplikacije niacina na proizvodnju mleka kod krava u ranoj laktaciji	98
5.6 Uticaj statusa niacina na morfolometrijska svojstva hepatocita i adipocita	99
6. DISKUSIJA	102
6.1 Uticaj aplikacije niacina na vrednost njegovih vitamina u krvi	102
6.2 Uticaj aplikacije niacina na lipidni profil krava, glukoze, insulin i indekse insulinske rezistencije	104
6.3 Uticaj aplikacije niacina na vrednost ostalih metaboličkih parametara	110
6.4 Uticaj aplikacije niacina na povezanost metaboličkih parametara sa stepenom lipolize i ketogeneze	112
6.5 Uticaj aplikacije niacina na proizvodnju mleka kod krava u ranoj laktaciji	115
6.6 Uticaj statusa niacina na morfolometrijska svojstva hepatocita i adipocita	117
7. ZAKLJUČCI	102
8. LITERATURA	121
9. BIOGRAFIJA AUTORA	139

1.UVOD

Peripartalni ili tranzicioni period se definiše kao period 3 nedelje pre i 3 nedelje posle teljenja i najkritičnija je faza u laktacionom ciklusu. Ovaj period se karakteriše značajnim smanjenjem u uzimanju hrane i negativnim energetske bilansom i lipidnom mobilizacijom koja dovodi do povećanja koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) u krvi i povećanu sadržinu triglicerida (TGC) u jetri uz mobilizaciju proteina i endokrinološke promene zbog podrške partusa i laktogeneze. Ovaj period je najizazovniji i najrizičniji period u proizvodno-reproduktivnom ciklusu visokomlečnih krava, jer su krave u stanju izrazitog stresa zbog intenzivnih endokrinih i metaboličkih promena, koja prate telenje i pokretanje laktacije.¹ U toku ovog vremenskog okvira, metabolizam gravidnih krava ili krava u laktaciji suočava se sa nizom promena u homeostazi sa hormonalnim promenama i metaboličkim stresom. U ovom periodu organizam favorizuje kataboličke procese u tkivima da bi se omogućilo kontinuirano snabdevanje mlečne žlezde sa potrebnim prekursorima. Mlečna žlezda kod visokomlečnih krava ima veliku potrebu za glukozom, jer količina proizvedenog mleka prvenstveno zavisi od stepena sinteze laktoze u ćelijama mlečne žlezde.² Zbog toga se u jetri intenzivira proces glukoneogeneze, a u masnom tkivu intenzivira se proces lipomobilizacije. Jedna od najvažnijih promena sa kojim se suočava organizam je promena u masnom tkivu gde je zbog smanjenog unosa hrane smanjen priliv nutrienata za sintezu i skladištenje masti, a lipidne rezerve su već u mobilizaciji.

U govedarskoj proizvodnji se intenzivno ispituju različite strategije i mogućnosti da se lipomobilizacija, ketogeneza ili inflamacija u ovom periodu ublaže i stave pod kontrolu. Niacin je vitamin sa antilipolitičkim delovanjem, čiji vitamer nikotinska kiselina značajno utiču na stepen lipomobilizacije tako što je smanjuju. Antilipolitičko delovanje niacina uglavnom je bio predmet istraživanja brojnih studija u prošlom veku u humanoj i veterinarskoj medicini. Carlson (2005)³ je opisao niacin kao jedinjenje sa dva lica jedno je vitamin a drugo je lek za regulisanje lipidnog tkiva. Nova brojna istraživanja ukazuju na pozitivne efekte upotrebe farmakološke doze niacina na metabolizam i produkciju kod visokomlečnih krava u peripartalnom period.^{4,5,6} Niacin odnosno njegov vitamer nikotinamid je reaktivna polovina nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP), koji učestvuju u brojnim metaboličkim redoks reakcijama u organizmu, zbog čega je njihov značaj izuzetno veliki.

Smatra se da kod krava postoji dovoljna koncentracija niacina zbog aktivnosti mikrobiološke flore buraga. Ipak, da bi mikroflora mogla da obezbedi dovoljnu količinu niacina potrebno je da se obezbedi dovoljno prekursora iz hrane. Napomenuli smo da u tranzicionom periodu krave unose daleko manje hrane nego što je potrebno, sa značajnim opadanjem apetita u periodu neposredno pre i posle teljenja, što povećava potrebe za dodavanjem niacina kod krava u hranu u peripartalnom periodu.

Cilj ove disertacije je da se ispita uticaj aplikacije niacina na metabolizam lipida u peripartalnom periodu, da se utvrdi da li aplikacija niacina utiče na insulinsku rezistenciju, vezu između metaboličkih parametara i lipolize i ketogeneze i uticaj aplikacije niacina na koncentracije NAD-a i NADP-a. Predpostavka je da se upotrebom niacina može ublažiti prekomerna lipomobilizacija i ketogeneza kod peripartalnih krava kao i metabolička adaptacija, koja nastaje kao posledica lipolize i ketogeneze. Pored navedenog, biće utvrđeno da li su NAD i NADP korisni pokazatelji statusa niacina kod krava u ranoj laktaciji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Metaboličke promene u peripartalnom periodu kod krava sa posebnim aspektom na metabolizam lipida

Kontrola metabolizma tokom graviditeta i laktacije uključuje dva tipa fiziološke regulacije - homeostazu i homeorezu.⁷ Homeostatska kontrola podrazumeva održavanje fiziološkog ekvilibriuma ili održavanje fiziološke sredine u kojoj se odvijaju fiziološki procesi i svaka promena brzo se uklanja. Homeoreza je koordinisana promena u metabolizmu neophodna za podršku fiziološkog stanja. Najizraženiji primer homeoreze je kod mlečnih krava gde iniciranje laktacije značajno menja metabolizam mnogih tkiva krave u cilju snabdevenosti mlečne žlezde hranljivim materijama potrebnih za sintezu mleka. Bell (1995)⁸ je opisao tri karakteristike koje prate homeorezu tokom ovog perioda a to su: mobilizacija energetske rezerve, endokirine promene koje održavaju laktogenezu i izmenjena osetljivost na insulin.

Neposredno pre partusa i u prvim danima laktacije dolazi do metaboličkih i hormonalnih promena u organizmu radi podrške laktacije. U peripartalnom periodu značajno su povećane potrebe u hrani i energiji, ali porast produkcije mleka u ranoj laktaciji nije praćen sa slobodnim povećanjem uzimanja hrane, zbog čega se krava u toku rane laktacije nalazi u negativnom energetsom bilansu (NEB). Mlečne krave moraju da mobilišu telesne rezerve uglavnom masti, da bi se nadoknadio gubitak energije preko mleka. Kao adaptaciju, organizam ulazi u homeoretske promene u hormonalnoj regulaciji u cilju podrške laktaciji, što dovodi do preusmeravanja hranljivih materija, uglavnom iz masnih rezervi ka mlečnoj žlezdi

Promene metabolizma koje prate peripartalni period kod mlečnih krava su: intenziviranje procesa glukoneogeneze u jetri, snižena koncentracija glikoze, restrikcija u potrošnji glukoze u perifernim tkivima, mobilizaciju lipida iz masnih depoa uz povišenu koncentraciju neesterifikovanih masnih kiselina kao alternativni izvor energije za ekstramamarna tkiva i povećana mišićna proteoliza. Hormonalne promene su: povećana koncentracija kortizola (koja pomaže lipomobilizaciju i glukoneogenezu), povišena koncentracija hormona rasta (koja omogućuje povećanu upotrebu hranljivih materija u mlečnoj žlezdi i dovodi do pada osetljivosti na insulin), snižena koncentracija IGF-I (zbog sniženog anaboličkog efekta hormona rasta u perifernom tkivu uprkos njegovoj povećanoj koncentraciji) i snižena koncentracija insulina (koja

nastaje zbog smanjenog unosa hrane i smanjene receptorske osetljivosti). Nekoliko dana pre partusa dolazi do pada koncentracije insulina i njegovo održavanje na niskom nivou u prvih desetak dana laktacije. Metabolički efekti iz ovih promena su povećana dostupnost glukoze i aminokiselina do fetusa i mlečne žlezde dok do perifernih tkiva dospeva veća količina NEFA i ketona.

2.1.1 Negativan energetska bilans

U peripartalnom periodu dolazi do naglog povećanja potreba u hranljivim materijama neophodnih za razvoj ploda i sintezu mleka, kao i do prilagođavanja brojnih metaboličkih procesa i ostalih telesnih funkcija novonastalom metaboličkom stanju. U toku poslednje 3 sedmice graviditeta, potrebe hranljivih materija za fetus i placentu su najizraženije, a uzimanje suve materije hrane se smanjuje za 10 do 30 % upoređeno sa uzimanjem suve materije u toku ranog zasušenja krave.⁸ Dakle, glavne fiziološke promene u organizmu majke se odvijaju da bi se obezbedilo dovoljno nutrienata za tele, prenatalno i postnatalno. Budući da proizvodnja mleka naglo poraste od nulte vrednosti do količine adekvatne za prehranu mladunčeta, samo prilagođavanje mora biti brzo, zbog čega se često javlja izražena nesrazmera između potreba i mogućnosti prilagođavanja. Sa druge strane u industriji proizvodnje mleka ovaj period laktacije se koristi za selekciju krava na proizvodnju mleka, pa se pravi još veći selekcijski pritisak na krave, dajući akcenat na proizvodnju mleka, a u značajno manjoj meri sposobnošću prilagođavanja metabolizma krava, što dovodi do brojnih problema u ranoj laktaciji i brojnih deficitarnih stanja. Pik laktacije očekuje se od 4.-8. nedelje, a najveći unos suve materije obroka se postiže posle 10.-22. nedelje posle partusa.⁹ Negativan energetska bilans kod mlečnih krava je najizraženiji oko 14. dana laktacije, a isti autor navodi da to može trajati i do 72. dana laktacije.¹⁰ Tokom rane laktacije, količina energije, koja je potrebna za održavanje telesnih tkiva i proizvodnju mleka premašuje količinu energije, koju krava može da dobije iz hrane. Kao rezultat ove pojave, javlja se negativan energetska bilans (NEB). Indikatori koji ukazuju da se mlečne krave postpartum nalaze u negativnom energetskom bilansu su: povišena koncentracija plazma NEFA, povišena koncentracija beta-hidroksi butirata (BHB), smanjena koncentracija glukoze, smanjena količina insulina i insulin-sličanom faktoru-1 (IGF-1), smanjena koncentracija leptina, zamašćenje jetre zbog akumulacije triglicerida u jetri i smanjen indeks telesne kondicije (BCS).

8,11,12

Za kompenzaciju negativnog energetskog bilansa, mobilisu se telesne rezerve, oko 0.6kg/na dan masti i 0.04 kg /na dan proteina u prvih 8 nedelja posle teljenja.¹³ Zbog nemogućnosti životnje da se adaptira na ove promene, u početku laktacije vrlo je učestala pojava metaboličkih poremećaj. Postpartalna metabolička oboljenja međusobno su zavisna i obično se javljaju zajedno, sa velikim uticajem na plodnost životinja. Sindrom masne infiltracije i degeneracije jetre, ketoza, puerperalna pareza, mastitis, hipomagnezemija, acidoza rumena, dislokacija abomazusa, laminitis, postpartalne infekcije i problemi sa plodnošću su najčešća oboljenja, koja se mogu javiti kod mlečnih krava u peripartalnom perio.¹⁴ Dyk i sar. (1995)¹⁵ su zabeležili da povećana koncentracija NEFA za vreme poslednjih 7 dana pre partusa je asocirana sa povećanom incidencom ketoze, dislokacijom abomazusa i zadržkom postelice ali ne i sa pojavom mlečne groznice. Posledica ove pojave je smanjen zdravstveni kapacitet, dobrobit i produktivnost krava.

Količina potrebne glukoze za proizvodnju 1 kg mleka je 72 g glukoze.¹⁶ Kod preživara najveći deo ugljenih hidrata koji dolazi sa ishranom fermentiše se u rumenu, a samo mali deo glukoze se apsorbuje iz digestivnog trakta. Zbog toga mlečne krave svoju potrebu za glukozom u najvećem delu zadovoljavaju sa glukoneogenezom- sintezom glukoze iz propionata, aminokiselina, glicerola i laktata u jetri. U jetri se postpartalno intenzivira stepen glukoneogeneze sa povećanjem ekspresije ključnih enzima kao što su piruvat karboksilaza i fosfoenolpiruvat karboksikinaza.¹⁷ U periodu kada je unos hranljivih materija u organizmu smanjen a potreba za energijom u mlečnoj žlezdi povećana, organizam mora da obezbedi mlečnoj žlezdi dovoljnu količinu energije da bi se održala perzistencija laktacije, što ostvaruje na nekoliko načina, pomoću metaboličke adaptacije, koja je omogućena hormonalnim promenama i odgovora tkiva tim hormonalnim promenama. Povećavanje glukoneogeneze u jetri, trošenja rezervi glikogena u jetri, povećavanje lipolize, katabolizam proteina, restrikcija u korišćenju glukoze u svim telesnim tkivima osim u mlečnoj žlezdi su neki od alternativnih načina kojima organizam omogućuje potrebe mlečne žlezde. Koncentracija hormona rasta se povećava za vreme partusa što povećava odgovor adipoznog tkiva na lipolitičke signale kao što je delovanje norepinefrina. Rezultat je povećano oslobađanje NEFA iz adipoznog tkiva, koja se u jetri konvertuje u ketonska tela, koja se dalje upotrebljavaju kako alternativno gorivo za ekstramamarna tkiva. Ketoni su alternativni izvor energije koji mogu zameniti glukozu u više tkiva, pa se glukoza može koristiti za sintezu mleka. Povećana koncentracija somatotropina isto

tako povećava glukoneogenezu.¹⁸ Koncentracija kortikosteroida povećava se za vreme partusa, kortikosteroidi povećavaju odgovor adipocita na delovanje ketoholamina i stimulišu glikogenezu i glukoneogenezu.¹⁹ Niska koncentracija insulina u krvi i smanjena insulinska senzitivnost omogućuje uzimanje hranljivih materija od strane mamarne žlezde na insulin-nezavistan način a insulin zavisna tkiva povećavaju oksidaciju masnih kiselina i smajuju korišćenje glukoze.

Činioci koji utiču na uzimanje hrane i pojavu negativnog energetskeg bilansa su brojne. Telesna kondicija krava u toku telenja ima uticaja na uzimanje hrane, krave koje imaju veću telesnu kondiciju uzimaju hranu u manjim količinama. Porast koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina što nastaje kao rezultat povećane lipolize ima negativan efekat u uzimanju hrane, insulinska rezistencija i homeoretsko delovanje hormona rasta smanjuje apetit kod krava.²⁰ Visoke koncentracije cirkulišućih estrogena su važan faktor u smanjivanju uzimanja suve materija u periodu oko partusa.¹² Povećana sekrecija adipocitokina TNF α i IL-6 (oni su proinflamatorni citokini produkovani od strane različitih ćelija) smanjuju apetit. Leptin je adipokin koji reguliše uzimanje hrane preko njegovog efekta na centralni nervni sistem, a povećanje supresira uzimanje hrane i povećava potrošnju energije.²¹

Nekoliko istaživača su pokazali da krave koje su selekcionisane za veću proizvodnju mleka, veći deo raspoložive energije prerasprodeluju ka proizvodnju mleka pre nego na rast telesnih tkiva.^{22, 23}

Ovoj period negativnog energetskeg bilansa je asociiran i sa imunosupresijom, peripartalnim oboljenjima i produženim vremenom za prvu ovulaciju i prvu koncepciju.

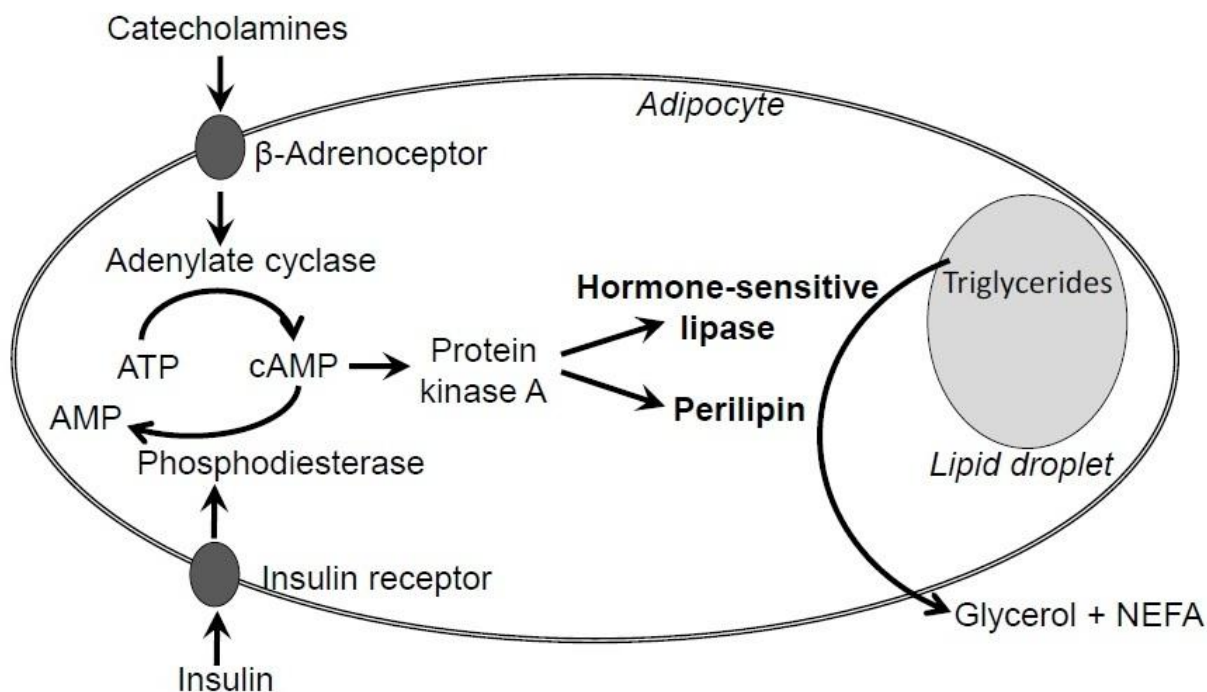
2.1.2 Metabolizam lipida u peripartalnom periodu

Uloga masnog tkiva u metabolizmu krava je višestruka. Masno tkivo ima potpurnu ulogu, i pruža mehaničku zaštitu, učestvuje u regulaciji toplote, ćelije masnog tkiva imaju i endokrinu ulogu i masno tkivo predstavlja najveći endokrini organ. Adipozno tkivo igra važnu ulogu kao izvor energije organa u formi masnih kiselina i glicerola, u vreme kada dotok energije ne zadovoljava potrebe organizma. Ova uloga masnog tkiva posebno je izražena za vreme negativnog energetskeg bilansa u toku peripartalnog perioda. Masno tkivo je jedan od glavnih

meta homeoretske kontrole u toku peripartalnog perioda kod krava. U kasnoj laktaciji i sušnom periodu u organizmu krave dominiraju anabolički procesi i organizam skladišti trigliceride u adipozno tkivo, koje je tada osetljivo na insulin, kao glavni antilipolitički hormone koji u ćelijama masnog tkiva smanjuje razlaganje triglicerida, i ubrzava sintezu masnih kiselina i glicerola. Negativan bilans energije u ranoj laktaciji dovodi do niza promena u metabolizmu, koje imaju za posledicu intenziviranje katabolizma u masnom tkivu i mobilizaciju masti iz telesnih rezervi. Ovo uključuje razlaganje triglicerida, koji su skladiřani u adipocite i oslobođjenja neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) i glicerola. Mobilizacija adipoznog tkiva je posredovana od sličnih enzima po funkcionalnosti MGL (Monoglyceride Lipase), HSL (Hormone-Sensitive Lipase) i ATGL (Adipose Triglyceride Lipase).²⁴ ATGL je inicijator lipolize, a aktivnost HSL je vezana za diacilglicerol i MGL za monoacilglicerol. Povećana aktivnost triacilglicerol lipaze primećena je kada u krvi imaju niske koncentracije insulina. Sam naziv hormon senzitivne lipaze ukazuje na to da hormoni kao što su ketoholamini, ACTH i glukagon stimulišu aktivnost ove intracelularane neutralne lipaze. Aktiviranje HSL-a dešava se fosforilacijom rezidue serina (Ser563) na HSL proteinu. Fosforilacija rezultira povećanom hidrolitičkom aktivnošću, translokacijom HSL-a od citosola na površine lipidnih kapi i povećanim razlaganjem TAG-a u ćelijama.²⁵ Pokretanje procesa mobilizacije masnih kiselina iz telesnih rezervi nije indukovana samo energetske deficitom već nastaje i kao rezultat promene neuroendokrine regulacije. Kontrola lipolize je kompleksna i uključuje više mehanizama. Neuroendokrini regulacija uključuje adrenergičnu stimulaciju ose β -receptori–adenilat ciklaza – protein kinaze A–hormon senzitivna lipaza (slika 1).²⁶ Hormonalne promene kao što su niska koncentracija insulina i glukagona smatra se da ima veoma važnu ulogu u nastanku i održavanju procesa mobilizacije masti, a smanjena insulinska rezistencija kao znak smanjenja funkcioanlnog kapaciteta insulina ima veoma veliki značaj.²⁷ Niska koncentracija insulina u krvi povećava aktivnost triacil glicerol lipaze i inhibira ulazak NEFA, glicerola i glukoze u adipocite, tako što smanjuje aktivnost lipoprotein lipaze (enzim koji hidrolizuje triacilglicerole u hilomikronima i lipoproteinima niske gustine) i ekspresiju-translokaciju GLUT 4 molekula. Kada postoji redukovana osetljivost na insulin ili niska koncentracija insulina u serumu, što je situacija tipična za ranu laktaciju, adipozno tkivo započinje lipolizu i time se serumska koncentracija NEFA povećava. Kod preživara, acetat je glavni supstrat za *de novo* sintezu masnih kiselina i masno tkivo je glavni organ u kome se odvija ovaj proces. Stupanj inkorporacije acetata *in vitro*, u *de*

novo sintezi masnih kiselina u adipoznom tkivu je značajno smanjen u kasnom graviditetu (15 dana prepartum) upoređeno sa 120. i 240. danom laktacije, a aktivnost je potpuno stopirana u ranoj laktaciji.²⁶ Hipoinsulinemija i smanjena osetljivost adipoznog tkiva na insulin je glavni razlog za smanjenje lipogeneze. Hormon rasta značajno može smanjiti odgovor adipoznog tkiva na lipogene efekte insulina i promovisati lipolizu u toku tranzicionog perioda. Citokini potpomožu proces lipomobilizacije putem smanjenja apetita narušavanjem osetljivosti perifernih tkiva na insulin i direktnom stimulacijom procesa lipolize.²⁸

Kao rezultat intenziviranja procesa mobilizacije masnih kiselina iz telesnih rezerva dolazi do povišenja koncentracije NEFA u krvi. Masne kiseline, oslobođene iz masnog tkiva pomoću lipoprotein lipaze, vezuju se u krvi sa albuminima i u tom obliku se prenose do tkiva gde će biti iskorišćena. Dalja sudbina NEFA može biti različita. Neesterifikovane masne kiseline se metabolišu u raznim tkivima ali glavno mesto razlaganja masnih kiselina je jetra. Kako koncentracija NEFA u krvi raste oko teljenja i u ranoj laktaciji, veliki deo NEFA su preuzeti od strane hepatocita, deo masnih kiselina krvne plazme direktno se koristiti za sintezu mlečne masti u vimenu ili kao izvor energije za periferna tkiva. Metabolički procesi u kojima učestvuje NEFA u jetri su: (1) kompletna oksidacija masnih kiselina uz prisastvo O_2 do CO_2 i H_2O i stvaranje velike količine ATP, (2) parcijalna oksidacija do acetil-KoA i sintezu ketonskih tela koja su oslobođena u krvotok i predstavljaju gorivo za druga tkiva (3) formiranje triglicerida iz NEFA u procesu resinteze i njihov transport iz jetre putem VLDL, (4) reesterifikacija NEFA i formiranje triglicerida koji ostaju u hepatocitima i dovode do masne degeneracije i masne infiltracije jetre koje predstavljaju veliki problem u proizvodnji i zdravlju krava. Visok stupanj lipolize u adipoznom tkivu povećava apsorpciju NEFA iz jetre i time se povećava sadržaj triglicerida u jetru. U ranoj laktaciji, krave imaju visok skup sadržaja lipida i triglicerida u jetri dok se sadržaj glikogena smanjuje.²⁹ NEFA i BHBA su značajno povećani kod krava koju imaju visok BCS oko teljenja.³⁰

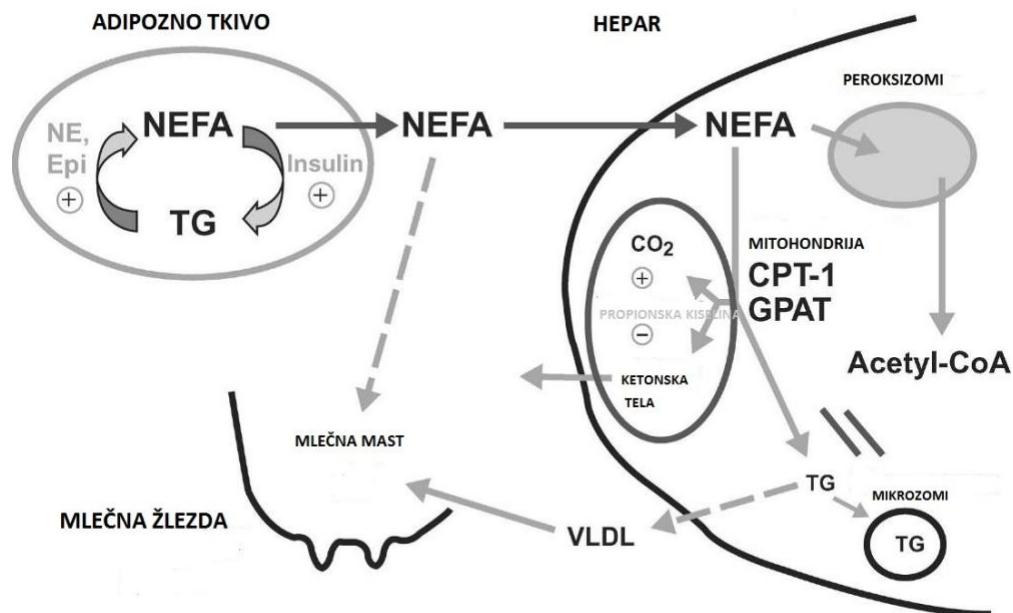


Slika 1. Celularna kontrola lipolize. Hormonalna aktivnost hormon sensitivne lipase dešava se preko ciklične AMP zavisne protein kinaze (PKA), koja fosforiliše HSL i perillpin i dolazi do oslobodanja slobodnih masnih kiselina iz adipoznog tkiva. Hormonsku kontrolu HSL uključuje lipolitičke (β -adrenergične agoniste, ACTH, itd) i antilipolitičke hormone (insulin, adenzin, itd), njihove srodne receptore signališućih puteva, proteine kao što je perilipin, HSL lipaze.

Oksidacija masnih kiselina se odigrava u mitohondrijama i peroksizomima (Slika1). Acil-CoA sintetaza dugog lanca (ACSL), karnitin palmitoil transferaza (CPT-IA) i acil-CoA dehidrogenaza dugog lanca (ACADL) su važni enzimi za oksidaciju masnih kiselina i odgovorne su za aktivaciju masnih keselina, translokaciju i β -oksidaciju u mitohondrijama. Ulazak masnih kiselina dugih lanaca u mitohondrije je zavisna od energetske potrebe ćelija i kontrolisana je od enzima karnitin palmitoil transferaze (CPT-IA). Transportni mehanizam NEFA u mitohondrijama se aktivira delovanjem glukagona, a inhibira delovanjem insulina, malonil-CoA, acetata, glukoze i propionata. Aktivnost CPT I je promenjena u teku tranzicije i za vreme idukovane ketoze sa restrikcijom hrane.³¹ Nedostatak karnitina, može smanjiti kapacitet oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama i time doprineti njihovoj većoj reesterifikaciji u trigliceride. Ako je prevelika količina NEFA, koja dolazi u jetru ili ako je oksidativni kapacitet jetre iscrpljen, tada umesto totalne oksidacije, NEFA se parcijalno metabolizira u formi ketonskih

tela ili esterifikuje u formi triglicerida. Ponova esterifikacija masnih kiselina je process, koji se odigrava u jetri i dovodi do deponovanja triglicerida u citoplazmi hepatocita. Kada preuzimanje i/ili de novo sinteze masnih kiselina prevaziđe kapacitet njihove potpune oksidacije i sekrecije iz hepatocita dolazi do akumulacije triglicerida u jetri i pojavu masne infiltracija ili masne degeneracije jetre. Uzrok pojave masne jetre kod preživara treba tražiti u pojačanom prilivu masnih kiselina u hepatocite, koja dolazi kao rezultat pojačane lipolize, a vrlo minimalno u njihovoj *de novo* sintezi zbog toga što kod preživara za razliku od nepreživara, *de novo* sinteza masnih kiselina u jetri je veoma mala.¹⁹ Ključni enzim u sintezi triglicerida u jetri je diacil glicerol acil transferaza, koji katalizuje prenošenje acil grupa sa acil-KoA na glicerol 3-fosfat.

Kod preživara prirodna karakteristika je da u krvi sadrže nisku koncentraciju lipoproteina vrlo male gustine (VLDL) koji imaju značajnu ulogu u transportu triglicerida iz jetre u druga tkiva, a posebno mlečnu žlezdu i pored toga uvećana je akumulacija lipida u jetri.³² Oba i NEFA i VLDL mogu se koristiti u produkciji mlečne masti (slika br.2).³³ Svi činioci koji dodatno ograničavaju oksidaciju masnih kiselina kao i oni koji remete sintezu VLDL, doprinose pojavi masne jetre, jer se na taj način favorizuje nakupljanje triglicerida u hepatocitima. Povećana koncentracija NEFA u plazmi može biti detektovana između 1. nedelje prepartum i 2. nedelje postpartum. Povećana koncentracija BHBA kao i povećana sadržina triglicerida u jetri može se očekivati u navedenom periodu i potom.³⁴



Slika 2. Šema metaboličke veze između adipoznog tkiva, jetre i mlečne žlezde za vreme tranzitnog perioda; NE- norepinefrin. Epi-epinefrin, CPT-1- karnitin palmitoiltransferaza-1, GPAT- glycerol-3-fosfat aciltransferaza, TG- trigliceridi, CoA-koenzim A, VLDL-lipoproteini vrlo male gustine (adaptirano prema Drackley i sar.,1999) ³³

Acetil-KoA nastao β -oksidacijom masnih kiselina i razlaganjem ugljenih hidrata uključuje se u ciklus limunske kiseline. Ulazak acetil-KoA u ciklus limunske kiseline zavisi od količine raspoloživog oksalacetata. Oksalacetat je intermedijer za glukoneogenezu i poteban je i za metabolisanje acetil-KoA, dakle nedostatak oksalacetata može inhibirati i glukoneogenezu i oksidaciju masnih kiselina. Kada količina acetil-KoA prevaziđe kapacitet ciklusa limunske kiseline da ga oksidiše, višak acetil-KoA se usmerava ka stvaranju acetonskih tela: acetoacetat, β -hidroksibutirat i aceton. Ova tri jedinjenja nazivaju se ketonska tela. Stepen formacije ketonskih tela je direktno proporcionalan sa stupnjom oksidacije masnih kielina iako konverzija acetylCoA u ketonska tela je manje energetski efikasan od kompletne β oksidacije.³⁵ Ovo je važno zbog toga što za vreme laktacije najveći deo dostupne glukoze (>80%) se koristi u mamarnoj žlezdi, a vitalni organi (mozak) ne mogu metabolisati masne kiseline kao izvor energije i oni se oslanjaju na oksidaciju ketona za normalnu funkciju. Ketoza je definisana kao stanje sa povišenim vrednostima ketonskih tela u krvi ili drugim medijumima (urinu i mleku). Kod preživara, a naročito kod visokoproduktivnih krava u toku ranog stadijuma laktacije kada je velika potrošnja glukoze, kao i kod visokogravidnih krava veoma često dolazi do ketoze. Kod

ovih životinja količina sinteze laktoze je velika, i najveći deo potrebe za glukozom podmiruje se glukoneogenezom. Glavni prekursor glukoneogeneze je oksalacetat, koji se sada pod uslovima povećanih potreba u glukozu troši i prazni iz ciklusa limunske kiseline. Izvlačenje oksalacetata iz ciklusa limunske kiseline ima za posledicu skretanje acetyl-KoA u pravcu proizvodnje acetonskih tela. Ketoza krava je praćena veoma visokim koncentracijama ketonskih tela u krvi, mokraći i mleku, padom koncentracije glukoze u krvi i povećanjem koncentracije masnih kiselina u krvi. Nagomilavanje acetata i zbog toga povećana ketogeneza takođe može nastati pri povećanom razlaganju masnih kiselina i smanjenoj sintezi masnih kiselina.

Drackley i sar. (2001)³⁶ našli su da u toku peripartalnog perioda 525 g NEFA može biti dostupan za esterifikaciju i može se sintetisati 583 g triglicerida u jetri dnevno. Produžena hiperlipidemija opterećuje hepatocyte sa lipidima u većoj koncentraciji nego što jetra ima kapacitet da ga metaboliše što rezultuje zamašćenjem jetre u kojoj su vidljivi makroskopske i mikroskopske alteracije, koji postaju izraženije sa većom infiltracijom lipida. Promene u masnoj jetri su povezane sa promenom metabolizma ugljenih hidrata, proteina i masti u hepatocitima. Povećana infiltracija triglicerida u jetri ima uticaj i na funkcionalni integritet hepatocita povezana je sa smanjenjem proizvodnje energetskih prekursora (smanjena glukoneogeneza) i povećana lipogeneza u jetri.³⁷ Smanjena je sposobnost insulina da poveća sintezu proteina i ureagenezu, čime se može objasniti povećana koncentracija amonijaka u plazmi kod krava sa masnom jetrom.³⁸

2.2 Faktori koji utiču na lipidnu mobilizaciju i ketogenezu kod krava u peripartalnom periodu

2.2.1 Uticaj genetske predispozicije na lipidnu mobilizaciju

U poslednjih 50 godina kod krava se obavlja intenzivna transgeneracijska genetska selekcija za poboljšavanje proizvodnje mleka tokom rane i ukupne laktacije. To čini krave jedinstvenim među svim drugima vrsta sisara. Ovakva selekcija rezultirala je mnogim fiziološkim promenama kod krava, koje olakšavaju veću mobilizaciju energetski važnih tkiva.

Masno tkivo krava sa većom genetskom sposobnosti za proizvodnju mleka imaju bržu lipolizu, povećan odgovor na beta adrenergičke stimulacije, povećanu aktivnost hormon senzitivne lipase i smanjenu lipogenezu upoređeno sa kravama sa prosečnom genetskom

predispozicijom za proizvodnju mleka.³⁹ Lipoliza u adipoznom tkivu je tesno povezana sa produkcijom mleka, pa kako progresira laktacija i produkcija mleka dostiže pik, tako se lipoliza povećava. Mlečne krave koju su selekcionisane za povećanu proizvodnju mleka imaju povećanu insulinsku rezistenciju koja rezultuje većom mobilizacijom lipida i manjom telesnom kondicijom.⁴⁰

2.2.2 Uticaj telesne kondicije na lipidnu mobilizaciju

Telesna težina nije dobar indikator za ocenu telesne rezerve, jer na to utiču različiti biološki faktori. Andrew i sar. (1994)⁴¹ su objavili da energetske rezerve mogu varirati i do 40 % kod krava sa sličnom telesnom težinom, zbog čega je uveden termin telesna kondicija krava, odnosno body condition scores BCS i sistem za njegovo ocenjivanje u kome se subjektivno procenjuju rezerve skladištene energije kod mlečnih krava. Ocena se vrši u okviru skale od 1 - 5 gde se krave sa vrednostima ispod 2 boda karakterišu kao mršave a preko 4 boda kao ugojene. Optimalan fiziološki BCS kod krava Holštajn-frizijske rase je 3.25 - 4.00 tokom zasušenja i 3.25 - 3.75 u peripartalnom periodu. Fiziološki prihvatljivi nivo gubitka u telesnoj kondiciji između zasušenja i rane laktacije je do 0.7 bodova. Nekoliko ispitivanja ukazuje na to da ugojene krava imaju veći gubitak u BCS čak do 0.87 boda.^{42, 43} Krave koje su ugojene za vreme partusa imaju tendenciju da izgube više telesnih masti nego krave sa optimalnom telesnom kondicijom.⁴⁴ Odnos između BSC za vreme teljenja i gubitka BSC u ranoj laktaciji je veoma značajan i pod je uticajem genskih faktora. Tokom završne faze laktacije i u preiodu visokog graviditeta energetske potrebe se lako zadovoljavaju i postoji pozitivan energetski bilans, što omogućava kravama da se višak energije taložiti u vidu masti, glikogena i proteina. Krave koje su tokom kasne laktacije i zasušenja unosile više hrane i koje su postale gojazne pokazale su tendenciju povećane lipolize sa višim koncentracijama NEFA u krvi uz produženo trajanje negativnog energetskog bilansa posle teljenja, zbog toga što krave koje imaju veću telesnu kondiciju uzimaju hranu u manjim količinama.⁴⁵ Šamanc i sar. (2015)⁴³ ukazuje na to da kod Holštajn krava sa visokim BCS dolazi do povećanog stepena lipidne mobilizacije iz adipoznog tkiva, smanjenog eksporta triglicerida iz jetre, smanjena glukoneogenetska sposobnost i narušen metabolizam bilirubina. Visoka BCS u period pre teljenja i izražen gubitak telesne kondicije nakon teljenja dovodi do subkličičke ili kliničke ketoze. Ketozne krave imaju povišen BCS za vreme teljenja i

za vreme prvih nedelja postpartum upoređeno sa zdravim kravama, a ketozne krave zagube značajno više telesne kondicije u određeno vreme u odnosu na zdrave krave.⁴⁶

2.2.3 Uticaj hormonalnih promena na lipidnu mobilizaciju

Za vreme peripartalnog perioda kod krava dolazi do promene u hormonalnom bilansu. U cilju adaptacije na novonastalo stanje i pokretanje niza homeoretskih procesa dolazi do lipolize u adipoznom tkivu. Mobilisu se masne rezerve organizma i koriste kao alternativni izvor energije u perifernim tkivima u cilju obezbeđenja kontinuiranog dotoka glukoze u mlečnu žlezdu. Za vreme laktacije, regulatorni sistem uključuje mnogo bioloških nivoa organizacije: osu hipotalamus-hipofiza (prolaktin i hormon rasta); reproduktivni sistem (estrogeni i proestrogen); pankreas (insulin i glukagon) i simpatički nervni sistem (norepinefrin). Adaptacija na laktaciju uključuje promene u sekreciji ovih hormona i promene u genetskoj transkripciji, osetljivost receptora na hormone i enzimsku aktivnost u masnom tkivu. Svaki od ovih regulatornih sistema ima efekat lipogeneze, esterifikacije ili lipolize u adipoznom tkivu. Regulacija lipolize je pod uticajem većeg broja hormona, no insulin i hormon rasta igraju glavnu ulogu. Insulin i hormon rasta u metabolizmu adipoznog tkiva imaju suprotne uloge i njihov međudnos je važan u regulaciji metabolizma masti.

Insulin je kompleksan polipeptid, sastavljen od 2α i 2β subjedinice, a luče B ćelije pankreasa. Povećava ulazak glukoze u mnoga periferna tkiva uključujući mišićno i masno tkivo. Poluživot insulina u cirkulaciji je kratak, oko 5-10 minuta, i zato je potrebno stalno lučenje ovog hormona da bi se održavale odgovarajuće metaboličke aktivnosti. Odgovor insulina je sporiji kod preživara nego kod nepreživara. Jedan deo insulina iz krvi se vezuje za receptore na odgovarajućim ćelijama, unosi u citoplazmu, gde izaziva fiziološke efekte i nakon toga se razlaže pomoću insulin proteaze.

Glavna uloga insulina u organizmu je da omogući upotrebu glukoze kao izvora energije. Kod preživara ima značajnu ulogu i u metabolizmu masti. Efekat insulina na metabolizam glukoze zavisi od sekrecije insulina iz pankreasa i od insulinske osetljivosti skeletnih mišića, adipoznog tkiva i jetre. Insulin omogućuje transport glukoze kroz ćelijsku membranu, jer utiče na povećanje broja transportnih proteina za glukozu u membrani ciljnih ćelija a to se posebno odnosi na ekstrahepatična tkiva, mišićno i masno tkivo .

Kada je koncentracija insulina u organizmu fiziološkim granicama i u organizmu nema promjenjene insulinske senzitivnosti tada insulin ispunjava anabolički efekat. Insulin pomaže stvaranju zaliha masti u perifernim tkivima, te je antilipolitički i antiketogeni hormon. Svoj antilipolitički efekat ispoljava suprimiranjem lipolize inhibiranjem aktivnosti enzima protein kinaze A i hormon senzitivne lipaze u masnom tkivu i na taj način sprečava mobilizaciju masti. Dodatno stimuliše sintezu masnih kiselina stimulacijom transporta glukoze kroz membranu ćelija masnog tkiva, te se od ove glukoze u adipocitima sintetišu masne kiseline i glicerol. Sa ovako obezbeđenim prekurzorima za sintezu triglicerida insulin stimuliše sintezu triglicerida u adipocitima i stvaranje masnog depoa. Kod preživara suisparljive masne kiseline iz gastrointestinalnog trakta, sirćetna i buterna, glavni lipogeni material. Promet acetata u perifernim tkivima za vreme insulinske rezistencije je smanjen, dok je očuvan u mamarnoj žlezdi, u kojoj nije regulisan insulinom. Buterna kiselina je substrat za produkciju ketonskih tela i hepaticna produkcija ketonskih tela je smanjena pod dejstvom insulina. Antiketogeno dejstvo insulina ispoljava se lipogenezom i inhibiranjem lipolize a takođe se intenzivira korišćenje ketonskih tela. Kada u ćeliji ima dovoljno količine glukoze obezbeđene putem piruvata i oksalacetata, ne stvaraju se ketonska tela tokom oksidacije glukoze. Insulin je najvažniji hormon koj inhibiše glukoneogenezu u jetri tako što suprimira ekspresiju gena za enzime, koji su ključni u glukoneogenezi.

Nekoliko dana pre partusa i prvih desetak dana laktacije dolazi do pada koncentracije insulina.⁴⁷ Sa smanjenom koncentracijom insulina i pojavom insulinske rezistencije stanja tipičnog za peripartalni period, lipoliza i proteoliza su neizostavni, a ovako se obezbeđuju substrati za glukoneogenezu i za produkciju energije. Smanjena koncentracija insulina isto tako dovodi do oslobađanja NEFA iz adipoznog tkiva.⁴⁸

Hormon rasta ili somatotropni hormon (STH) je peptidnihormone, koji se luči iz prednjeg režnjahipofize. Kod mladih jedinki stimuliše rast, a kod mlečnih krava povećava se produkcija mleka. Hormon rasta ima veoma važnu metaboličku ulogu, jer stimuliše sintezu proteina u svim ćelijama organizma naročito u mišićnom i mamarnom tkivu, povećava oslobađanja masnih kiselina iz masnog tkiva i njihovu oksidaciju, antagonizira lipogene efekte insulina i povećava nivo glukoze u krvi. Hormon rasta je primarno regulisan od strane dva antagonistička hormona iz hipotalamusa somatotropni oslobađajući hormon (GRH) koji stimuliše sekreciju somatotropina i somatostatina, koji inhibira sekreciju somatotropina. Oslobađanje STH je regulisano i putem

mehanizma negativne povratne sprege. Insulinu sličan faktor rasta (IGF-I) i STH inhibiraju oslobađanje STH tako što inhibiraju sekreciju GRH a stimulišu oslobađanje somatostatina. U toku tranzicionog perioda kod mlečnih krava dolazi do raskidanja negativne povratne sprege između IGF-I i hipotalamusa što izaziva povećanje koncentracije STH u krvi.⁴⁹ Kod mlečnih krava koncentracija hormona rasta u plazmi se povećava do kraja graviditeta, za vreme partusa postiže maksimalnu koncentraciju, nakon toga dolazi do laganog snižavanje njegove vrednosti. Kod mlečnih krava, funkcija STH je značajna za obezbeđenje mlečne žlezde nutrutentima, na taj način povećava protok krvi kroz mlečnu žlezdu, poboljšava lipolizu u adipoznom tkivu i glukoneogenezu u jetri. Hormon rasta kod krava inhibira insulinom stimulisanu lipogenezu u adipoznom tkivu, tako što inhibira insulin-posredovano preuzimanje glukoze u adipocitima a povećava lipolitički efekat ketoholamina, tako što povećava broj β -adrenergičkih receptora. Ovakve promene u odgovoru masnog tkiva na insulin kod ketoholamina dovode do povećnog oslobađanja masnih kiselina.⁵⁰ Intenzivan metabolizam masti i povećana koncentracija NEFA u plazmi i jetri može da dovode do pojačane sinteze ketonskih tela u jetri. Sve ove promene koje ostvaruje hormon rasta dovode do neto efekta raspodele nutrienata daleko od adipocita i obezbeđuju mamarnu žlezdu sa potrebnim hranljivim materijama, čime se povećava proizvodnja mleka, a povećana lipoliza zadovoljava periferna tkiva u energetske potrebama.

Glukagon luče A ćelije pankreasa i za razliku od insulina on je katabolički hormon. Koncentracija glukagona kod preživara povećava se postpartum, što se poklapa sa periodom kome dolazi do smanjenje koncentracije glukoze u krvi.⁵¹ Niža koncentracija insulina i viša koncentracija glukagona obezbeđuju preovlađivanje glukoneogeneze i glikolize da bi se obezbedila potrebna energija uprkos nutritivnim nedostacima. Glukagon kod preživara prvenstveno utiče na hepaticnu glukoneogenezu jer stimuliše konverziju propionata u glukozu. Infuzija glukagona u ranoj laktaciji kod krava povećava ekspresiju hepaticne mRNA za piruvat karboksilazu, enzim koji ima ključnu ulogu u glukoneogenezi.⁵² Za razliku od glukagona inusulin smajuje glukoneogenezu i zbog toga je smanjenje odnosa insulin/glukagon važna adaptacija u peripartalnom periodu da bi se podstakla hepaticna glukoneogeneza.

Metabolizam u većini tkiva, uključujući i adipozno tkivo, delimično je kontrolisan aktivnošću simpatičkog nervnog sistema. Ketoholamini, epinefrin i norepinefrinse izlučujuna krajevima simpatičkih nervnih vlakna i u srži nadbubrežne žlezde, te deluju kao potentni lipolitički stimulatori. Ketoholamin daje primarni stimulus za povećanje mobilizacije NEFA iz

adipoznog tkiva . Norepinefrin iz simpatičkog nervnog sistema vezuje za adrenergične receptore ćelijske membrane, tako što preko G-proteina povećava proizvodnju adenil ciklaze, koju stimuliše formacija intracelularnog cAMP, onda cAMP aktivira protein kinazu A, koja fosforiliše i aktivira regulatorne proteinske subjedinice na hormon senzitivnu lipazu i perilipin što pokazuje slika 1 u poglavlju 1.⁵³ Sve ovo dovodi do povećanja lipolize i oslobađanja masnih kiselina iz adipoznog tkiva. McNamara (1987)⁵⁴, je utvrdio da bazalna lipoliza i maksimalni odgovor adipoznog tkiva na ketoholamin kod mlečnih krava su povećani za vreme laktacije, što ukazuje da povećan maksimalni odgovor adipoznog tkiva na ketoholamin dovodi do povećane lipidne mobilizacije u cilju podržavanja homeostaze.

2.2.4 Insulinska rezistencija i transport glukoze

Insulin je jedan od najvažnijih metaboličkih hormona, koju mogu imati uticaj na homeostazu kod krava, u toku različitih fizioloških stanja od zasušenja do laktacionog perioda. Tokom različitih fizioloških stanja može biti promenjen odgovor insulina na glukozu i odgovor tkiva na insulin. Ove promene su definisane kao insulinska rezistencija i fenomen senzitivnosti.^{27,55} Insulinska rezistencija razvija se kod mnogih vrsta životinja u toku graviditeta i produžava u toku laktacije.

Insulinska rezistencija je patofiziološki termin koji označava umanjen odgovor insulina na glukozu tj. smanjenu funkciju β ćelija pankreasa (*eng., insulin responsiveness*) i/ili povećanu rezistenciju perifernog tkiva na insulin (*eng., insulin sensitivity*).⁵⁶ Insulinska rezistencija se može definisati na nekoliko nivoa: prerceptorski (smanjena sinteza i/ili lučenje insulina), receptorska (smanjenje broja receptora ili njihovog afiniteta za insulin) i postreceptorska (intracelularni problem na nivou sekundarnih glasnika i promene u GLUT receptorima). Kod mlečnih krava insulinska rezistencija počinje pre partusa i produžava se u toku rane laktacije i primećeno je da je to važan faktor za započinjanje kataboličke aktivnosti.⁵⁷ U osnovi insulinske rezistencije, redukovana je senzitivnost target ćelija na odgovor normalnog nivoa insulina.⁵⁸ U ovom stanju, normalna koncentracija insulina prouzrokuje umanjeni biološki odgovor. Ovako smanjena senzitivnost sa istovremeno smanjenom koncentracijom insulina menja korišćenje glukoze u telu, jer glukoza postaje manje dostupna za ćelije koje su zavisne od insulina. Smanjena senzitivnost na insulin smanjuje kontrolu lipolize i mobilizaciju NEFA od strane insulina.

Transport glukoze kroz membranu ćelija obavlja se preko dva različita procesa: olakšanom difuzijom posredovanom membransko-vezanim transportnim molekulima za glukožu (GLUT) i natrijum zavisnog aktivnog transporta posredovanog od Na⁺/glukoze kotransportera (SGLT) (Zhao i Keating,2006).² GLUT molekule mogu biti podeljenena dve grupe: insulin zavisni GLUT4 i insulin nezavisni GLUT 1,2,3 i 5. Svaki transporter glukoze igra specifičnu ulogu u ćelijskom metabolizmu, koji se određuje po tkivu u kome se nalazi, specifičnosti substrata i ekspresijom u različitim fiziološkim stanjima. GLUT 4 je insulin-senzitivan transporter glukoze i kod goveda je detektovan kod svih insulin zavisnih tkiva, mišićnog i adipoznog tkiva.⁵⁹ GLUT 1, 2 i 3 spadaju u insulin nezavisne molekule i kod krava u laktaciji u mamarnu žlezdu najzastupljeniji je GLUT 1 transporter glukoze, a isto tako ekspresiju u različitim nivoima imaju i GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT8, GLUT 12 i Na-zavisni SGLT1 i SGLT2 transporter. Pokazalo se da je transporter sa niskim afinitetom glukoze GLUT 2 kod goveda uključen u regulaciju sekrecije insulina iz beta ćelja, oslobađanju glukoze iz jetre i oslobađanju absorbovane iresorbovane glukoze u tankom crevu (jejunalni region).^{60, 61} GLUT 3 je glavni transporter glukoze u mozgu, no primećena je ekspresija mRNA GLUT 3 u goveđim ovarijalnim folikulima i u žutom telu, a Nishimoto i sar.,(2006)⁶² su приметili da ekspresioni nivo GLUT 3 u goveđim jajnicima je uporediv sa ekspresijom u mozgu. Ovakva različita ekspresija tkivno specifičnih GLUT molekula omogućava da insulin ima kontrolu preraspredele glukoze u celom organizmu. Kao što je već istaknuto GLUT 4 je glavni insulin zavisni transporter glukoze u muskularnom i adipoznom tkivu, a niska koncentracija insulina izrazito smanjuje ekspresiju GLUT4 proteina. Kada je smanjena insulinska stimulacija, GLUT4 proteini su sklonjeni iz plazmine membrane putem endocitoze i recikliraju se kao intracelularne zalihe.² Tako se smanjuje korišćenje glukoze za potrebe masnog i mišićnog tkiva a povećava se raspoloživost glukoze za potrebe mamarnog tkiva koje je insulin nezavisno. Transport glukoze u mamarnom tkivu je regulisan od višestrukih glukoza-transportnih izoformi kako što su GLUT 1,8, 12 i SGLT1. Ekspresija mRNA ovih transportera od kasnog graviditeta do rane laktacije povećava se za 5 - 10 puta za GLUT 8, 12 i SGLT1 i oko sto puta za GLUT 1.⁶³ Ovakva preraspodela glukoznih transportera u organizmu omogućava da potrebe marnarne žlezde budu zadovoljene, a priliv glukoze u mlečnu žlezdu je konstantan dok se druga ektramamarna tkiva snabdevajusa energijom iz drugih alternativnih izvora, kao što su lipidi. Na broj receptora i njihov afinitet za vezivanje uticaj ima insulin, drugi hormoni, ishrana, fizička aktivnost, fiziološko stanje i drugi faktori.

2.3 Uticaj lipidne mobilizacije i ketogeneze na metaboličke parametre

Lipidna mobilizacija ogleda se u povećanoj koncentraciji NEFA u krvi, dok se ketogeneza definiše kao stanje sa povećanom koncentracijom BHB u krvi, urinu ili mleku. Koncentracija NEFA se povećava jednu do dve nedelje prepartusa i dostiže svoj maksimum za vreme telenja ili u prvoj nedelju laktacije.⁶⁴ Koncentracija plazma NEFA u peripartalnom periodu može varirati od <0.5 - 2 mmol/l. U fiziološkim uslovima kod mlečnih krava koncentracija NEFA u serumu je niža od 0.4mmol/l. Prema Drackley-u (2000)⁶⁵, kod krava koje se nalaze u pozitivnom energetsom bilansu koncentracija NEFA može biti i manja od 0.2 mmol/l, no kod krava u tranzicionom periodu je uvek povećana iznad 0.5 mmol/l, a kod krave koje se nalaze u jakom negativnom energetsom bilansku koncentracija NEFA u plazmi može biti iznad 1.5 mmol/l.⁶⁶ Šest nedelja nakon partusa vrednosti NEFA treba da budu ispod 0.3 mmol/L.⁶⁵ U toku kasne gestacije, naročito za vreme zadnje nedelje graviditeta, apetit opada, što vodi do negativnog energetsog bilansa za vreme telenja, i time se podstiče dalja mobilizacija rezervi tela. Kada je oksidativni kapacitet u jetri prevaziđen, dolazi do povećane produkcije ketonskih tela i njihove povećane koncentracije u plazmi. Povećana koncentracija NEFA i BHB u plazmi je povezana sa energetsom deficitom, promenama u hormonalnom statusu, sa promenom u odgovoru targetnog tkiva na hormone i sa metaboličkim promenama hipoglikemijom, hipoalbuminemijom, hiperbilirubinemijom, hipokalcemijom, povećanom aktivnosti jetrinih enzima i hematološkim promenama.

2.3.1. Uticaj NEFA na nastanak insulinske rezistencije

Mnoga istraživanja ukazuju na uticaj NEFA na nastanak insulinske rezistencije. Ovakva istraživanja su naročito intenzivno obavljena kod ljudi radi utvrđivanja povezanosti lipida i nastanka insulinske rezistencije.^{67, 68, 69} Povećana koncentracija NEFA u krvi prouzrokuje akumulaciju triglicerida u mišićnom tkivu i u jetri kod nepreživara i indukuje insulinsku rezistenciju.⁷⁰ Mobilizacija masnih kiselina iz adipoznog tkiva suprimirana je odstranjenjem insulina. Kada adipozno tkivo postane insulin rezistentno, lipoliza se dodatno povećava, što dovodi do *circulus vitiosus*-a između vrednosti NEFA i insulinske rezistencije.

Shulman (2000)⁷¹ je utvrdio da je promet glukoze, a ne intracelularan metabolizam glukoze, razlog nastanka insulinske rezistencije indukovane masnim kiselinama. On je predložio model u kome masne kiseline i nekoliko potencijalnih metabolita uključujući acetyl-CoA, ceramida i diacilglicerola služe kao signalni molekuli koji aktiviraju protein kinazu C izoenzim, pa nakon toga ove kinaze mogu narušiti insulinsku signalizaciju sa povećanjem fosforilacije inhibitornog serina na insulinski receptorski substrat, ključni medijator insulinske receptorske signalizacije. Osim poremećaja u prenosu insulinskog signala dolazi i do smanjenje translokacije GLUT 4 na ćelijskoj membrani i ulaska glukoze u ćelije.⁷⁰ Povećana koncentracija NEFA osim toga što prouzrokuje insulinsku rezistenciju, može da prouzrokuje i slabu inflamaciju perifernih tkiva.⁷² Faktori kao što su gojaznost, hiperinsulinemija i hiperlipidemija su povezani sa razvojem insulinske rezistencije kod ljudi, a ovi faktori su povezani sa pojavom metaboličkih bolesti kod preživara u peripartalnom periodu.⁷³ Povezanost NEFA sa nastankom insulinske rezistencije ispituje se i kod preživara naročito kod krava rase Holštajn. Nekoliko rezultata ukazuju na to da je stanje insulinske rezistencije uslovljeno povećanom koncentracijom NEFA u plazmi.^{56,74, 75} Pires i sar. (2007)⁷⁵ ukazuju da sa intravenskom aplikacijom triglicerolne emulzije koja indukuje hiperlipidemiju kod Holštajn krava, dolazi do insulinske rezistencije kod ovih krava. Ovakva infuzija sa emulzijom povećava NEFA u krvi, serumski triacilglicerol i glicerol. U drugom istraživanju kod krava Hoštajn rase kod kojih je izvedena restrikcija hrane, aplikovan je antilipolitički agens -nikotinska kiselina, da bi postigli različite koncentracije NEFA u krvi, pa su došli do zaključka da smanjena koncentracija NEFA poboljšava odgovor insulina kod krava ograničenih sa hranom, što pokazuje da je NEFA značajan faktor nastanka insulinske rezistencije.⁷⁶

2.3.2 Uticaj NEFA na glukoneogenezu

Kod preživara se ugljeni hidrati iz hranemetabolišu u rumenu u isparljive masne kiseline i zato je proces glukoneogeneze od velike važnosti za ove životinje. Ovim procesom se obezbeđuje oko 90 % potrebne glukoze. Kod krava u laktaciji potrebe u glukozu su velike, jer proces glukoneogeneze mora funkcionisati kontinuirano, a svaki defekat može dovesti do ozbiljnih metaboličkih poremećaja.

Kada u organizmu preovlađuje negativni energetska bilans, visoka koncentracija NEFA može da deluje na piruvat karboksilazu (PC) i fosfoenil piruvat karboksilazu (PECK), enzime

koji imaju važnu ulogu u glukoneogenezi. Ovi enzimi katalizuju piruvat u fosfoenolpiruvatnu kisleinu, koja se koristi za sintezu glukoze. Nivo mRNA piruvat karboksilaze I fosfoenil piruvat karboksilaze i aktivnost ovih enzima bili su značajno smanjeni kada je koncentracija NEFA bila povećana sa 0.5 na 1.5 mmol/l.⁷⁷ Druga ispitavanja su utvrdila statistički značajno smanjenje metabolizma propionske kiseline (glukogen pesursor) kada sevrednost palmitske kiseline povećala sa 0 na 2 mmol i smanjenje glukoneogeneze iz propionata za 23 % kada koncentracija oleata bude povećana sa 0.1 na 2 mmol.^{78,79} Povišena akumulacija triglicerida i ketona u jetri može smanjiti jetrenu funkciju što može dovesti do razvoja brojnih metaboličkih poremećaja.⁸⁰ Jetra je glavni organ u kome se odvija proces glukoneogeneze, pa akumulacija hepatocita sa trigliceridima i ketonima može smanjiti njihovu sposobnost za glukoneogenezu. Ovi nalazi ukazuju da visoki nivo NEFA u cirkulaciji inhibira hepatocitnu glukoneogenezu i tako smanjuje nivo koncentracije glukoze u krvi čime dodatno doprinosi negativnom energetsom bilansu.

2.3.3 Uticaj NEFA na metabolizam masnih kiselina i triglicerida

Kao rezultat negativnog energetskeg bilansa u peripartalnom periodu dolazi do povećane lipolize, jer se NEFA koristi kao prekursor energetskeg potreba tkiva. Ova pojava je najviše izražena kod visokomlečnih krava. NEFA može da ima važnu ulogu u nastanku mnogih metaboličkih poremećaja i drugih bolesti kod peripartalnih krava, koje su u vezi sa poremećajem metabolizma organskih materija. Kada je NEFA povišena, kod preživara dolazi do povećanja triglicerida u jetri za samo nekoliko dana zbog njihovog prirodno niskog kapaciteta za sekreciju triglicerida preko VLDL. Za vreme negativnog energetskeg bilansa visoke koncentracije NEFA mogu oštetiti enzime koji učestvuju u metabolizam masnih kiselina, pa metabolizam oksidacije masnih kiselina pod dejstvom visoke koncentracije NEFA može biti promenjen. Oksidacija masnih kiselina u jetri odvija se u mitohondrijama, u četiri koraka: aktivacija, translokacija, β -oksidacija i ketogeneza.⁸¹ Acil-CoA sintetaza dugog lanca (ACSL), karnitin palmitoil transferaza (CPT-IA) i acil-CoA dehidrogenaza dugog lanca (ACADL) su najznačajniji enzimi u kontroli aktivacije, translokacije i β -oksidacije masnih kiselina u mitohondrijama. ACSL je enzim koji aktivira masne kiseline u acetil-CoA, kojije u daljem procesu masno kiselinske oksidacije i sinteze prelazi u triacilgliceride u jetri. ACADL je enzim koji katalizuje prvi korak β -oksidacije masnih kiselina sa dugim lancima u mitohondrijama. CPT-IA je enzim koji ima

glavnu ulogu u transportu masnih kiselina od citosola u mitohondrijalni matriks i on je primarni regulatorni enzim involviran u β -oksidaciju u mitohondrijama. U jednoj studiji ispitivan je efekat NEFA, pod različitim koncentracijama NEFA na metabolizam masnih kiselina gde se pokazalo da se ekspresija mRNA i proteina za ACSL i ACADL postepeno povećavaju sa porastom koncentracije NEFA.⁸² Ovi rezultati ukazuju da visok nivo NEFA može povećati oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama. Povećana ekspresija mRNA i proteina za CPT-IA su ispitivani pri koncentraciji NEFA manjoj od 1.6 mmol/l a smanjena ekspresija mRNA i proteina su ispitivane kada je koncentracija NEFA bila veća od 1.6 mmol/l. Ovo ukazuje da iako povećanje NEFA dovodi do povećanja ekspresije ACSL i ACADL u hepatocitima, vrlo visoka koncentracija NEFA (veća od 1.6 mmol/l) inhibira ekspresiju CPT-IA. Pored povećanja metabolizma masnih kiselina u masni acetyl-CoA, transport masnog acetyl-CoA u mitohondrijalni matriks je ograničan, te je oksidacija masnih kiselina u mitohondrijama ograničena. Nivo masnog acetyl-CoA je povećan zbog povećane ekspresije ACSL, i taj masni acetyl-CoA može biti esterifikovan u trigliceride, što dovodi do zamašćenja jetre ili može biti sintetizovan u ketonska tela.

Visoke koncentracije NEFA značajno podstiču hepatocitnu oksidaciju masnih kiselina tako što povećavaju aktivnost i β -oksidaciju masnih kiselina. Kada je koncentracija NEFA veća od 1.6 mmol/l, tada dolazi do značajne inhibicije CPT IA i redukcije transporta NEFA u mitohondrijama, smanjenja oksidacije masnih kiselina što može dovesti do ketoze i lipidoze jetre.⁸²

2.3.4 Uticaj lipolize i ketogeneze na metaboličke parametre u krvi

Ketonska tela su intermedijarni metaboliti dobijeni iz nekompletne oksidacije masnih kiselina. Kada se dostigne maksimalna sposobnost jetre da metaboliše NEFA u triglyceride i oksidiše masne kiseline dolazi do akumulacije masnih kiselina u hepatocitima, a acetyl CoA koji je dobijen od oksidacije masnih kiselina i nije iskorišćen u ciklusu trikarboksilne kiseline je konvertovan u ketonska tela, kao što su aceton, acetoacetat i beta-hidroksibutirat koji se mogu pojaviti u krvi, mleku i urinu. Ketonska tela može iskoristiti kao alternativan izvor energije mišićno tkivo, jer glukoza može biti iskorišćena za produkciju mleka. Ipak, produkcija ketonskih tela ne osloboda neto energiju, kao što se energija dobija sa potpunom oksidacijom masnih kiselina. Zbog produkciju velikih količina ketonskih tela dolazi do povećanog prisustva ketonskih tela i mogućnosti za metaboličke promene.

Koncentracija BHB je značajan indikator za zdravlje i produktivnost životinja. Subklinička ketoza je patološko stanje povezano sa povećanim nivoom ketonskih tela u organizmu (BHB>1200 do 1400 $\mu\text{mol/l}$) ali bez simptoma koji ukazuju na kliničku ketozu.⁸³ Subklinička ketoza u prvoj ili drugoj nedelji nakon teljenja povećava rizik četiri do osam puta za nastanak dislokacije abomazusa, tri puta je povećan rizik za metritis kada je serumski BHB u prvoj nedelji >1200 $\mu\text{mol/l}$, povećana je mogućnost za subklinički endometritis u prvih 4 nedelje nakon partusa, 4 do 6 puta je povećan rizik za pojavu kliničke ketoze kao i za prolongiran mastitis.^{51,83,84,85} Zabeležano je smanjenje u izlučenom mleku za 1.9 kg/dan kada je BHB >1400 $\mu\text{mol/l}$ u prvoj nedelji i za 3.3 kg na dan kada je BHB >2000 $\mu\text{mol/l}$ u drugoj nedelji. Krave kod kojih je serumski BHB > 1800 $\mu\text{mol/l}$ u prvoj nedelji imale su >300kg manju produkciju mleka u celoj laktaciji.⁸³ Nivo BHB u krvi koji ukazuje na kliničku ketozu su 2-3 mmol/l.⁸⁶

Tipičan metabolički profil kod krava u prvoj nedelji nakon teljenja u našim uslovima se odlikuje sa redukovanom koncentracijom glukoze, proteina, albumina, holesterola, kalcijuma uz visoke koncentracije bilirubina i jetrinih enzima.^{87,88} Trigliceridi i holesterol su pokazatelji energetskeg statusa krava a mogu ukazati ina funkcionalno stanje jetre. Koncentracija triglicerida i holesterola u serumu bile su značajno niže kod ketoznih krava upoređenju sa zdravim kravama u peripartumu.⁸⁹ Ovakav nalaz nastaje, jer povećana akumulacija masti u jetri smanjuje njihov dolazak u krvotok.

Fiziološka vrednost glukoze u krvi kod kasnog graviditeta krava je 2.5-4.2 mmol/L.⁹⁰ Koncentracija glukoze u prvim nedeljama postpartuma je značajno smanjena, zbog redukovano uzimanja hrane i povećanog korišćenja glukoze od mamarne žlezde. Značajno smanjenje glikemije ispod fiziološke granice je primećeno kod puerperalno ketoznih krava upoređenju sa zdravim gravidnim i puerperalnim kravama.⁸⁹ Smatra se da povećana koncentracija ketonskih tela dovodi do smanjenog uzimanja hrane.⁹¹ Na smanjenu koncentraciju glukoze ima uticaj povišena koncentracija ketonskih tela. Kod preživara jetra je glavni organ u kome se odvija proces glukoneogeneze, a zbog povećane akumulacije ketona menja se funkcionalni integritet hepatocita i intenzitet glukoneogeneze se smanjuje.⁹²

Koncentracija ukupnog bilirubina u krvnom serumu je veoma važan parametar za ocenu metaboličkog profila krava. Koncentracija bilirubina je blago povećana kod krava u peripartalnom periodu u poređenju sa ostatkom laktacije.⁸⁷ Kod puerperalnih ketoznih krava dolazi do značajno povećane koncentracije bilirubina upoređenju sa zdravim gravidnim ili

zdravim pueperalnim kravama.⁸⁹ Povećana koncentracija bilirubina je rezultat opterećenja hepatocita sa ketonima i u korelaciji je sa stepenom zamašćenosti hepatocita.⁹² Referentne vrednosti ukupnog bilirubina u krvnom serumu kod krava 10 - 15 dana pre teljenja iznose $4.7\mu\text{mol/l}$, a 10. dana posle teljenja su $5.4\mu\text{mol/l}$ a nakon tog perioda treba da pokazuju tendenciju opadanja.⁹³

Kod krava sa izraženom ketogenezom i lipolizom u prvoj i drugoj nedelji nakon teljenja dolazi do značajnog smanjenja u koncentraciji ukupnih proteina i tendenciju nižih koncentracija albumina.⁸⁸ Redukovana koncentracija ukupnih proteina i albumina može biti povezana sa biosintetskom funkcijom jetre, koja se smanjuje sa povećanim dolaskom ketonskih tela u hepatocite i sa povećanom upotrebom aminokiselina u procesu glukoneogeneze. Koncentracija ukupnih proteina kod krava je $67.5\pm 11.5\text{ g/l}$, koncentracija ukupnih proteina ispod 60 g/l povećava rizik od peripartalnih bolesti.^{94,95} Prosečna vrednost koncentracije albumina kod gravidnih krava iznosi $42,3\pm 2.2\text{ g/l}$ a kod krava u laktaciji je $39,4\pm 2.8\text{ g/l}$.⁹⁶ Đoković i sar. (2012)⁸⁹ utvrdili su značajno smanjenje koncentracije albumina kod ketoznih krava nakon partusa upoređeno sa zdravim kravama u kasnom graviditetu ili nakon partusa.

Povećana aktivnost hepatičnih enzima je karakteristika metaboličkog profila kod krava sa intenzivnim katabolizmom prve nedelje pre i nakon teljenja.⁸⁸ Glavni indikatori funkcije jetre i hepatičnih lezija su enzimi aspartat transaminaza (AST), gama-glutamil transferaza (GGT), glutamat dehidrogenaza (GLDH) i metaboliti glukoza, holesterol i albumin. Kada je jetra infiltrirana mašću dolazi do pojave lezije u njenom tkivu i nivo enzima (AST, GGT i GLDH), koji ukazuju na povrede hepatocita generalno su povećane.³⁷

Vrednosti NEFA i BHB su značajni dijagnostički pokazatelji za promenjen metabolički profil krava. Sa povećanjem vrednosti NEFA i BHB značajno se povećava frekvencija uzoraka krvi u kojima su mereni parametri izvan referentnih granica. Cincović i sar.(2012)⁸⁸ ukazuju da upotrebom ovih tri parametra NEFA i BHB iz metaboličkog profila moguće je predvideti varijacije ostalih parametra u preko 70 % slučajeva. Ovo ukazuje da NEFA i BHB značajno utiču na vrednost metaboličkih parametra krava u peripartalnom periodu.

2.4 Adaptacija adipocita i hepatocitana peripartalni period

2.4.1 Adaptacija adipocita

Kod mlečnih krava masno tkivo igra važnu ulogu kao izvor energije za podršku laktacije, što je posebno izraženo kod visokoproduktivnih krava. Kasna laktacija i period zasušenja su periodi u kojima dominira anabolička faza i povećano je skladištenje triglicerida u masnom tkivu. Za razliku od tog perioda, rana laktacija je period u kome dominira katabolička faza i mobilizacija masnog tkiva. Prekomerna mobilizacija masnog tkiva u periodu negativnog energetskeg bilansa u ranoj laktaciji može dovesti do zamašćenje jetre i ketoze, koja može kompromitovati produkciju mleka u toku cele laktacije. Ovaj ciklus lipidnog skladištenja i lipidne mobilizacije je tipičan metabolički fenomen kod mlečnih krava.

Belo masno tkivo je jedinstveno tkivo u organizmu koje može pretrpiti drastične promene u njegovoj masi nakon dostignuća adultne zrelosti. Celularni razvoj masnog tkiva podrazumeva celularnu hiperplaziju (povećanje u broju ćelija) i hipertrofiju (povećanje u veličini/volumenu ćelija). Hiperplazija se odvija tokom diferencijacije ćelija masnog tkiva tokom adipogeneze, dok hipertrofija dolazi posle stadijuma diferencijacije i rezultat je akumulacije triglicerida u postojećim adipocitima prvenstveno tokom pozitivnog energetskeg bilansa.⁹⁷ Kod mlečnih krava povećanje i smanjenje adipoznog tkiva za vreme laktacionog ciklusa uglavnom je u vezi sa promenama u veličini adipocita, a utvrđena je jaka veza između veličine adipocita, telesne kondicije i telesne težine.⁹⁸

Volumen adipocita varira u adipoznom tkivu, a ta varijacija je veća u visceralnom depou u poređenju sa intramuskularnim ili subkutanim adipoznim tkivom. Eguinoa i sar. (2003)⁹⁹ navode da je hijerarhija veličine adipocita ide sledećim redom: omentalno masno tkivo > perirenalno masno tkivo > subkutano masno tkivo > intramuskularno masno tkivo, što je se slaže sa istraživanjima drugih autora.¹⁰⁰

Modalitet rasta (proliferacijom ili diferencijacijom) u različitim depovima adipoznog tkiva može biti regulisana mnogo faktora, kao što su prekursori ćelijske populacije, protok krvi i gustina inervacije. U poređenju sa visceralnim mastima subkutano adipozno tkivo ima manje dimenzije i volumen ćelija i veću *de novo* lipogensku aktivnost kada se uzima u obzir veličina ćelije. Hormon senzitivne lipaze HSL i adipozna trigliceridna lipaza ATGL su enzimi koji su primarno involvirani u stimulanju lipolize i bazalne lipolize. Stimulisana lipoliza i bazalna lipoliza oslobađaju glicerol u toku hidrolize masnih kiselina iz triglicerida. Kod mišića,

ekspresija mRNA na hormon senzitivne lipaze i adipozne trigliceridne lipaze, bila je veća u retroperitonealnom adipoznom tkivu, u poređenju sa mezeterijalnim adipoznim tkivom, a najslabija ekspresija postojala je kod subkutanog adipoznog tkiva.¹⁰¹ Kod mlečnih krava u laktaciji nađena je povećana aktivnost hormon senzitivne lipaze i posleđičnopotencijalno viša lipoliza kod retroperiotonealnog masnog tkiva u odnosu na subkutano masno tkivo.¹⁰² Za vreme negativnog energetskog bilansa mobilizacija visceralnog masnog tkiva je favorizovana zajedno sa subkutanom masnim depoom.^{102,103,104} Aktivnost glicerol kinaze kod goveđeg adipoznog tkiva bila je mnogo manja.¹⁰⁵ Glicerol kinaza je fosfotransferazni enzim involviran u sintezu triglicerida i glicerofosfolipida.

U toku laktacije preživara zabeležana je maksimalna ketoholaminom stimulisana lipolitička aktivnost adipocita.¹⁰⁶ Odgovor i osetljivost na ketoholamine u toku laktacije je povećana slično u subkutanom masnom tkivu i u omentalnom masnom tkivu. Povećan broj β -adrenergični receptora u omentalnom masnom tkivu je najverovatnije primaran faktor za ovu pojavu, a povećanje maksimalne aktivnosti i količine adenilat ciklaze je glavni faktor u subkutanom adipoznom tkivu.¹⁰⁷

2.4.2 Adaptacija hepatocita

Hepatociti su ćelije jetrinog parenhima. Njihov oblik i veličina zavise od funkcionalnog statusa i od odnosa sa susednim ćelijama. Na fiksiranom histološkom preparatu su poligonalne, a u svežem izolovanom stanju okruglaste. Veličina jetrenih ćelija varira prosečno između 16 i 30 mikrometra. Granica među njima je dobro izražena. U režnjiću između hepatocita nalaze se sinusni kapilari koji dobijaju krv iz vena portobilijarnog prostora, a sprovode je u središnju venu. Hepatociti su poređani jedan do drugog u radijalno postavljene ploče, koje međusobno anastomoziraju. Veća skupina tih ploča grupisanih oko centralne vene čine jetreni režnjićilobulus hepatis. U citoplazmi se nalaze oba oblika endoplazmatskog retikuluma, mitohondrije i Goldžijev aparat. U hepatocitima se mogu naći i zrnca pigmenta lipofuscina i hemosiderina. Jetrene ćelije su vrlo osetljiveali imaju veliku sposobnost regeneracije. Nakon oštećenja jetre (trovanje, infekcija, poremećena cirkulacija) neoštećene ćelije u njoj se najpre povećaju (kompenzatorna hipertrofija) i tako u prvi čas nadomeste oštećene ćelije.

Prosta masna infiltracija (infiltratio adipoza hepatis) označava patološko stanje u jetri pri kome jetrene ćelije sadrže veće količine masti nego normalno. Uzroci masne infiltracije mogu da

budu različiti: preterana ishrana, smanjeni oksidativni procesi, izvesna fiziološka stanja (graviditet, laktacija), bolesti praćene hiperlipidemijom (acetonemija goveda) kao i dugotrajno gladovanje. U ovakvim slučajevima jetrine ćelije su u stanju da vrata svoj prvobitni izgled čim se otklone navedeni uzročni faktori, što znači da su funkcionalno sposobne da bez težih reperkusija odole ovakvom reverzibilnom procesu. Pri infiltraciji manjeg stepena jetra je neznatno uvećana a lobularnost građe jasnije istaknuta nego normalno. Masna infiltracija najpre počinje u perifernim delovima režnjića, zato ti delovi postaju svetliji, dok središni delovi ostaju uglavnom nepromenjeni. U jetrinim ćelijama histološki se konstatuju masti u vidu sitnijih i krupnijih kapljica, koje se pojavljuju najpre po rubovima režnjića a sa napredovanjem procesa i u centrolobularnim ćelijama. Sitne kapljice masti pokazuju tendenciju slivanja u veće kapi pa u jednom momentu hepatociti dobijaju izgled ćelija masnog tkiva

Jetra ima glavnu ulogu u kontroli preraspodele hraniljivih materija. Potreba za glukozom i metaboličkom energijom povećava se dvostuko do trostruko u peripartalnom periodu.³⁶ Protok krvi kroz v. porte i jetru povećava se dvostruko više tokom rane laktacije nego pre teljenja.¹⁰⁸ Jetra mora brzo da odgovori na naglo povećanje potrebe za glukozom i energijom za proizvodnju mleka i da se adaptira na veći priliv masti iz lipoliziranog masnog tkiva. Ćelije jetre uzimaju NEFA iz krvi i konvertuju ih u energente, u odnosu njihovu koncentraciju, što je važna adaptaciona strategija za podršku svoje funkcije i drugih tkiva. Međutim, produžena hiperlipidemija opterećuje hepatocite sa lipidima i većom koncentracijom nego što jetra ima kapacitet da ih metaboliše, te dolazi do pojave masne jetre. Preterana infiltracija lipidima, odnosno trigliceridima, prouzrukuje makroskopsku i mikroskopsku alteraciju jetre, koja postaje izraženijasa većom infiltracijom lipida. Jetra postaje uvećana i otekla i oko ivice ima bledo-žuti izgled. Histološki nalazi kod krava sa masnom jetrom su: masne vakuole u hepatocitima; povećan volumen kod individualnih hepatocita; oštećene mitohondrije; kompresija i smanjen volumen jedra, grub endoplazmatični retikulum, sinusoidi i druge organele.¹⁰⁹ Akumulacija triglicerida kod goveda sa srednje zamašćenim hepatocitima je ograničenu centrolobularnom delu jetre bliže hepatičnoj veni, no akumulacija se proširuje i na midzonalnu sekciju i onda se širi na periportalnu sekciju kod krava sa umerenom i teškom masnom jetrom. Mikroskopske alteracije ukazuju na oštećen celularni integritet i funkciju hepatocita, i prouzrukuju nekrozu i celularno "curenje", naročito kod krava sa teškom masnom jetrom, što se karakteriše sa povećanom koncentracijom enzima jetre i žučnih konstituenta u krvi. Histološke promene u masnoj jetri su

povezane sa promenom metabolizma ugljenih hidrata, proteina i masti u hepatocitima. Povećana infiltracija triglicerida u jetri je povezana sa smanjenom proizvodnjom prekursora energije (smanjena glukoneogeneza i varijabilni efekti ketogeneze i β -oksidacije) ipovećana lipogeneza u jetri.³⁷ Smanjena je sposobnost insulina da povećava sintezu proteina i ureagenezu, čime se može objasniti povećana koncentracija amonijaka u plazmi kod krava sa masnom jetrom.³⁸

2.5 Farmakokinetika i farmakodinamika niacina kod preživara

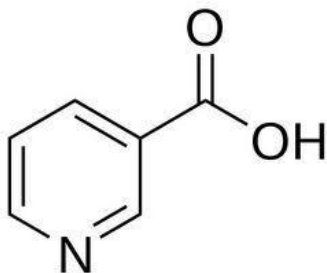
2.5.1 Fizička i hemiska svojstva niacina

Vitamini su raznolika grupa jedinjenja. Nutritivno, oni formiraju kohezivnu grupu organskih jedinjenja, koja su potrebna u ishrani u malim količinama (mikrograma ili miligrama dnevno) za održavanje normalnog zdravlja i metaboličkog integriteta. Oni se na taj način razlikuju od suštinskog značaja minerala (koji su neorganski) i od esencijalne aminokiseline i masne kiseline koje su potrebne u većim količinama. Da bi se jedna komponenta smatrala za vitamin, mora se pokazati da je dijetetski bitna, i da njegova eliminacija iz hrane mora rezultirati manje ili više jasnom deficitarnom bolešću, a njegovo vraćanje u ishrani mora izlečiti ili sprečiti tu deficitarnu bolest. Niacin i vitamin D ne ispunjavaju ove rigorozne kriterijume, zbog toga što u normalnim uslovima endogena sinteza zadovoljava zahteve organizma. Ipak oni se smatraju za vitamine, čak i samo na osnovu toga što je svaki od njih otkriven kao rezultat istraživanja deficitarne bolesti, pelagre i rahitisa.¹¹⁰

Pored sistematske hemijske nomenklature, vitamini imaju i trivijalna imena koja su naizgled nelogična no oni proizilaze iz istorije njihovog otkrića. Za nekoliko vitamina, brojno hemijski srodnih jedinjenja pokazuju istu biološku aktivnost, jer su ili konvertirani u istog konačnog aktivnog metabolita ili su dovoljno strukturno slični da imaju istu aktivnost. Različita hemijska jedinjenja koja pokazuju istu biološku aktivnost poznata su kao vitameri. Tamo gde jedna ili više komponenti imaju istu biološku aktivnost, i pored individualnog imena, odobrena je i generička deskripcija koja će biti upotrebljena za sve povezane komponente koji pokazuju istu biološku aktivnost. Termin niacin je generička deskripcija dveju komponenata, koji imaju biološku aktivnost vitamina: nikotinska kiselina i nikotinamid. To su dve forme vitamina B3 (iako neki autori ne prihvataju ovakvo nazivanje niacin) koji spada u grupu B-kompleks vitamina

rastvorljivih u vodi. Niacinamid je rastvorljiv u vodi i amidna je forma niacina. Kada se amidni molekul poveže sa nikotinskom kiselinom postaje niacinamid. Hemijsko ime je 3-piridinkarboksilna kiselina (eng., 3-pyridinecarboxylic acid) za nikotinsku kiselinu i 3-piridinkarboksiamid (eng., 3-Pyridinecarboxamide) za nikotinamid. Postoje antivitamini ili antagonisti niacina. Ove komponente imaju istu bazičnu strukturu piridina, a najvažniji antagonisti niacina su 3-acetil piridin i piridin sulfonska kiselina.

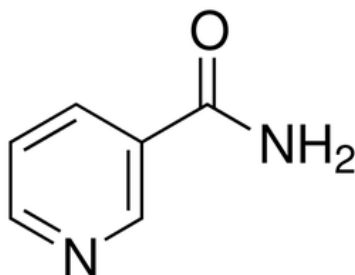
Empirijska formula nikotinske kiseline je $C_6H_5NO_2$. Nikotinska kiselina dobila je naziv po toksičnom alkaloidu nikotinu u čiji sastav ulazi. Drugi sinonimi za nikotinsku kiselinu su antipelagra vitamin, Pellagrin, Acidum nikotinicum, Pyridine-3-carbonic acid, Nicotinic acid (Eng), Nicotinsaure (Ger), Acide Nicotinique (Francuski) itd. Nikotinska kiselina se nalazi u formi belog kristala ili kristalnog pudera rastvorljivog u vodi, bez mirisa sa slabije kiselim ukusom, blago je rastvorljiv u etanol i etil etru, rastvorljiv u alkoholu i nerastvorljiv u većini lipidnih rastvarača, rastvorljiv u vodi 18.000 mg/l na 20°C, sa molekularnom težinom od 123.11 g/mol, tačka topljenja je 236.6 C°, specifična gustina 1.473, pH 2.7 (zasićeni vodni rastvor), pH 3-3.5 (1.3 % rastvor), gustina 1.473 na 25°C, stabilan na vazduhu, generalno stabilan u hrani, stabilan na toploti, kiselini i u bazi.¹¹¹ Rastvorena u vodi ova čvrsta materija je derivat piridinas karboksilnom grupom (COOH) u 3-poziciji. Strukturna formula nikotinske kiseline prikazana je na slici 3.



Slika br.3 Strukturna formula nikotinske kiseline

Empirijska formula nikotinamida je $C_6H_6N_2O$. Drugi sinonimi za nikotinamid su Vitamin PP, Niacinamid, Nicotic amide, Nikotine acid amide, Picolinamide, Nikota, Nicotinsaureamid (Ger.) Nikotinamidum (Lat.). Ima molekularnu masu od 122.12 g/mol. Beli kristalni puder ili bezbojan kristal, bez mirisa, gorkog ukusa, sa tačkom topljenja od 130-133°C, tačka vrenja je 150-160°C, rastvorljiv u vodi 500.000 mg/l na 25°C, rastvorljiv u etanolu, glicerolu, slabo

rastvorljiv u hloroformu. Specifična gustina od 1.400 na 25°C, pH vrednost je u granici od 6.0 - 7.5. Stabilan u određenim uslovima, stabilan na toploti, u kiseloj i alkalnoj sredini.¹¹² Strukturna formula nikotinamida je prikazana na slici 4.



Slika br. 4 Strukturna formula nikotinamida

2.5.2 Forme niacina

Vitamin niacin je od velike važnosti za energetske metabolizam. Fiziološki niacin se inkorporira u koenzimu nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP). Oni učestvuju u brojnim metaboličkim procesima to: a) u anaboličkim putevima (NADPH/NADP) kao što su sinteze lipida inukleiniskih kiselina, NADPH je neophodan kao redukujući agens i b) u kataboličkim putevima (NADH/NAD). NAD učestvuje u velikom broju oksidativno-reduktacionih reakcija kao nosilac elektrona i on može primiti ili donirati elektrone u reakcijama redukcije, odnosno može učestvovati kao oksidirajući agens NAD⁺ i primiti elektron, tako on postaje redukovan i formira se NADH, I postaje redukujući agens i donira elektron NADH i postaje oksidisan i formira se NAD. Pored toga NAD je izvor adenin dinukleotid fosfat (ADP)-riboze za modifikaciju proteina. On je prekursor za dva sekundarna glasnika (cADP-riboza i nikotinska kiselina adenin dinukleotid fosfat) koji stimulišu povećavanje intracelularne koncentracije kalcijuma. Zato oni igraju važnu ulogu u mnoštvu metaboličkih puteva. Sa druge strane utvrđeno je da kada se nikotinska kiselina aplikuje u mnogo većim dozama ispoljava još jedan fiziološki efekat a to je sposobnost da supresira lipolizu.^{76,113}

Niacin se nalazi u formi dva vitamera: nikotinska kiselina i nikotinamid. Obe forme imaju slične nutritivne karakteristike, i obe se mogu upotrebiti za sintezu NAD-a ali imaju različite biološke proporcije, samo nikotinamid može biti reaktivna komponenta.³

Izvor niacina može biti uneta hrana ili sama životinja može sintetizovati niacin putem enzimske konverzije triptofana i hinolonske kiseline u niacin. Mikroorganizmi u buragu isto tako sintetizuju niacin. Mikroorganizmi koriste aspartate i dihidroksiaceton fosfat za produkciju niacina.¹¹⁴

U istraživanjima iz prošlosti smatralo se da mlečne krave nemaju potrebu daim se egzogeno dodaju suplementi B vitamina zato što B vitamini koji se nalaze u ishrani i one koji ruminalna mikroflora sintetiše su u dovoljnim količinama.⁹ Ali visoko mlečne krave drastično su povećale produkciju mleka i time se povećava potreba za B vitaminom. Pored navedenog, smanjen unos hrane u peripartalnom periodu koji je često prolongiran daleko posle započinjanja laktacije smanjuje dotok prekursora iz hrane, koji su značajni za proizvodnju niacina u buragu, što dodatno povećava potrebu za njegovim dodavanjem u hrani.

Niacin koji se aplikuje oralno i može se naći kao niacin nezaštićen od razgradnje u buragu (eng., rumen non protected niacin) i kao niacin zaštićen od razgradnje buraga (eng., rumen protected niacin). Suplementi niacina koji nisu zaštićeni imaju slabu stabilnost u rumenu i razgrađuju se i zato se moraju primenjivati u većim farmakološkim dozama.¹¹⁵ Niacin koji je zaštićen od razgrađivanja u rumenu pakuje se na poseban način i još se naziva i inkapsulirani niacin. Ovaj produkt je u formi malih paleta, u čijoj sredini se nalazi niacin opkoljen sa nekoliko slojeva lipida. Inkapsulirana tehnologija može povećati bioraspoloživost komponenta u tankim crevama. Ovi lipidi su relativno nerastvorljivi u rumenu i time se prevenirarazgrađivanje niacin od strane mikroflora.¹¹⁶ Ovaj vitamin se može aplikovati i postruminalno, a ovakav način aplikacije je opisan od strane Grinari i sar. (1997).¹¹⁷ Infuzioni oblici niacina koji kod preživara mogu se aplikuju kao postruminalna infuzija, daju se kanilom preko rumena i omazusa u abomazus čime će se izbeći ruminalno mikrobno razgrađivanje niacina.

2.5.3 Absorpcija i distribucija niacina

Zbog fizioloških i anatomskih specifičnosti digestivnog trakta preživara, farmakokinetika (absorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija) medikamenta, koji se aplikuju oralno biće različita kod ovih životinja. Razlika u farmakokinetici lekova kod oralne aplikacije kod preživara postoji i u odnosu forme medikamenta (da li su zaštićeni od bakterijske flore buraga ili ne) a kod aplikacije niacina kod preživara postoji razlika i u farmakokinetici vitamera (nikotinska kiselina i nikotinamida).

Postoji razlika u metabolizmu nikotinske kiseline i nikotinamida, dve forme niacina, koji se koriste za biosintezu NAD-a.¹¹⁸ Nema razlike u totalnoj količini niacina u rumenu kada se poredi odnos koncentrata i kabaste hrane, kada je on u rasponu 40:60 do 60:40 ali je primećena razlika u koncentraciji svakog vitamera ponaosob.¹¹⁹

Mikroorganizmi u rumenu isto tako sintetišu niacin. Dnevna ruminalna sinteza niacina je viša od 2.2 g.¹²⁰ Prema Porter-u (1961)¹²¹ više niacina biće sintetisano od mikroflore kada se daje manja količina niacina kao suplement i obrnuto. Neka ispitivanja ukazuju na to da i vid ishrane ima uticaj na sintezu niacina. Zastupljenost ugljenih hidrata, koji ne potiču iz vlakana ima uticaja na sintezu B vitamina, pa se sinteza niacina poboljšava sa povećanom količinom ugljenih hidrata iz nevlaknastog hraniva, dok odnos između koncentrata i kabastog dela hrane nema efekta.¹²² Skrob ima pozitivan uticaj na sintezu svih B vitamina.

Dužina trajanja tretmana ima značajne efekte na koncentraciju nikotinske kiseline u ruminalnoj i intestinalnoj tečnosti. Koncentracija nikotinske kiseline postiže maksimum u buragu jedan sat po aplikaciji niacin nezaštićenog u buragu time što se nikotinamid konvertuje u nikotinsku kiselinu ili druge forme, Campbell i sar. (1994)¹²³ nisu detektovali nikotinamid u ruminalnoj tečnosti. Rezultati istraživanja Santaschi i sar. (2005)¹¹⁹ bili su suprotni od Cambella i sar. (1994)¹²³, oni pokazuju da oba vitamera, nikotinska kiselina i nikotinamid, su sintetizovani u značajnim količinama u predželudcima i najveći deo nikotinske kiseline i cela količina nikotinamida nalazi se u ćeliji bakterije.

Erikson i sar. (1991)¹²⁴ primetili su da je absorpcija niacina preko buraga moguća, jer se nikotinamid brže absorbuje od nikotinske kiseline. Međutim, direktna absorpcija iz buraga je limitirana zato što se mali procenat (3-7%) niacina nalazi kao supernatantne ruminalne tečnosti, a najveća količina niacina je vezana od ćelije mikroflore, dok nikotinska kiselina nije absorbovana zato što se u sredini gde je pH ispod fiziološke vrednosti nalazi u jonizovanoj formi. Posle peroralne primene, lekovi se mogu apsorbovati u svim delovima digestivnog trakta, pod uslovom da su nejonizovani. Prema Santachija i sar. (2005)¹²⁰ najverovatnije je da postoji nedostatak absorpcije u rumenu zato što vitamini prisatni u bakterijskoj frakciji u sadržini buraga nisu dostupni u slobodnoj formi da bi se mogli absorbovati.

U digestivnim sokovima abomasusa, ileuma i duodenuma niacin se nalazi kao supernatant frakcija. Absorpcija iz tankih creva je glavni način kojim niacin postaje dostupan za domaćina. Samo 17% od dodatog niacina se javlja u duodenum kao slobodana nikotinska

kiselina¹²³, odnosno 20-30% dospeva u duodenum kod ovaca u zavisnosti doze.¹²⁵ Prema Santaschi i sar. (2005)¹²⁰ procenat isčezavanja niacina u rumenu kod mlečnih krava je 98,5%, a prema Zinn i sar. (1987)¹²⁶ kod tovnih goveda je 93.8%. Koncentracija nikotinske kiseline u duodenumu je veća kod krava hranjenih sa nikotinamid suplementima (12g dnevno) u odnosu na krave hranjene sa suplementima nikotinske kiseline (Campebell i sar.,1994)¹²³. Međutim, u ovim istraživanjima uzete su samo duodenalne tečnosti a niacin se može naći i u čvrstoj frakciji iz crevne sadržine. U ovim istraživanjima aplikovan je niacin, koji nije zaštićen od razgradnje u rumenu. Zbog ektenzivne degradacije niacina u rumenu u nekim istraživanjima korišćene su mnogo veće količine niacina 12-36 grama/dan.¹¹⁵ Kada se aplikuje veća doza niacina, veća količina niacina je dostupna mikroorganizmima od onog što im je potrebno, pa je tada moguće da višak niacina odeu donji deo digestivnog trakta. Koncentracija niacina u duodenumu bila je veća kod onih životinja kod kojih je bio aplikovan niacin.^{123,127} Gubitak niacina se javlja i ako je niacin dat infuziono u abomazusmuali manjim procentom, oko 85%, što ukazuje na to da je moguća i abomazalna i duodenalna apsorpcija.¹²⁰

Koncentracija niacina koje dostiže u duodenum pre svega zavisi u kakvoj farmakološkoj formi se nalazi niacin (nezaštićen ili zaštićen), zatim od količine niacina i odnosa hraniva. Prema Niehoff I sar.(2013)¹²⁸ ukupna količina niacina (zbir nikotinske kiseline i nikotinamida) koja dolazi u duodenum povećava se sa povećanjem procenta koncentrata i suplementa nikotinske kiseline, dok je količina nikotiamida samo pod uticaj suplemenata nikotinske kiseline a ne zavisi od odnosa koncentrata.

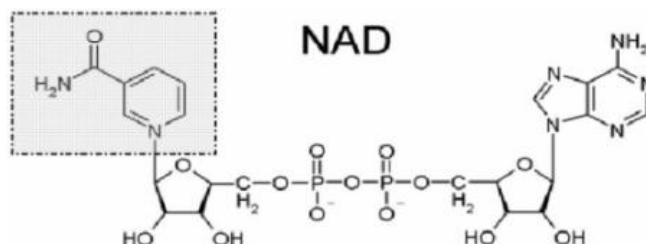
Nezasićena nikotinska kisleina ima slabu stabilnost u rumenu I Santaschi i sar.(2005)¹²⁰ su našli da nezasićena nikotinska kiselina ima 5% bioraspoloživosti. Suprotno, zaštićeni niacin izbegava razgradnju u mikroflori i daje mnogo veću bioraspoloživost u crevima.⁴ Sa aplikacijom ruminalno zaštićenog niacina Zimbelman i sar.(2010)¹¹⁶ su pokazali povećanu koncentraciju slobodnog niacina u krvi kod mlečnih krava. Morey I sar.(2011)⁵ navode da tretman sa inkapsuliranim niacinom povećava koncentraciju nikotinamida u plazmi tako da davanje 24 grama na dan inkapsuliranog niacina obezbeđuje 9,6 grama na dan bioraspoloživog niacina.

Absorpcija niacina odvija se u tankim crevima. Na absorpciju niacina u duodenum ne utiče tip ishrane.¹²⁹ Intestinalna apsorpcija nikotinske kiseline je na nivou od 73%, a nikotiamida na novou 94% sa prosekom od 84% od ukupnog niacina u dodenumu.¹²⁰ Prema Zinn i sar. (1987)¹²⁶ apsorpcija je na novou od 79% od duodenalnog nivoa niacina. Mehanizam absorpcije

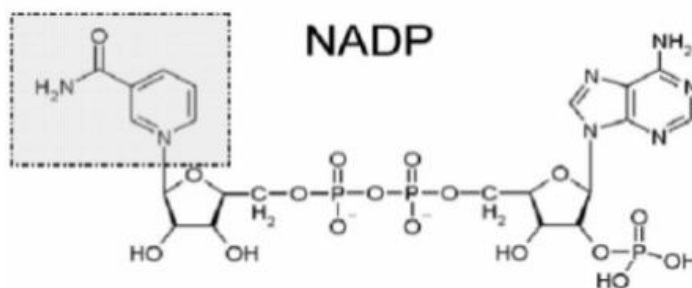
je ispitivan kod čoveka i pacova. U fiziološkim koncentracijama niacin absorpcija nikotinske kiseline kod čoveka zavisi od pH i Na⁺nosača.¹³⁰ U višim koncentracijama kod pacova je primećena difuzija kao glavni mehanizam absorpcije niacina.¹³¹ Najveća količina nikotinske kiseline absorbuje se iz duodenuma. Intestinalna mukoza je bogata enzimima kao što su NAD-glukohidrolaza koja konvertira nikotinsku kiselinu. Najverovatnijem direktno konverzije nikotinske kiseline u nikotinamid. Nikotinska kiselina u mukozni tankog creva brzo se konvertuje u NAD da bi potom posredstvom NAD⁺glukohidrolaze višak NAD hidrolizovao u nikotinamid, što je glavna forma transporta niacina u krvi.¹¹⁴ NAD⁺glukohidrolaza je enzim koji katalizira hidrolizu NAD-a i tom prilikom se stvara ADP-riboza i nikotinamid. U krvi krava koncentracija nikotinamida bila je 100 puta veća od koncentracije nikotinske kiseline.⁵ Pored toga što kisela sredina abomazusa favorizuje nikotinsku kiselinu niacinu plazmi se nalazi u formi nikotinamida.^{120,123} Koncentracija nikotinamida u plazmi nije zavistana od toga vida vitamera u suplementu, ali koncentracija nikotinske kiseline u plazmi je veća ukoliko su krave hranjene sa suplementom nikotinske kiseline u odnosu na suplement nikotinamida.¹²³ Nakon 50 sati po završetku tretmana nicinim Morey i sar. (2011)⁵ su zapazili da koncentracija nikotinamida u plazmi kod tretiranih krava se smanjuje ali pokazuje tendenciju da bude viša od kontrolne grupe (p<0.07). Nikotinamid je primarna forma niacina u cirkulaciji i konvertira se u formi koenzimna (NAD i NADP) u tkivu. Transport niacina je povezan sa eritrocitima u cirkulaciji. Niacin brzo napušta krvotok i ulazi u bubrege, jetru i adipozno tkivo. Ima velike neusaglašenosti za postojanje nikotinske kiseline u krvi, pa se smatra da je nikotinamid glavna forma za transport niacina u krvi,¹¹⁴ ali smatra se da nikotinska kiselina, koja nije metabolisana u jetri može biti transportovana u različitim tkivima u telu.¹³² Ovo je moguće postignuti sa aplikacijom veće farmakološke doze niacina, da bi se veća količina nikotinske kiseline apsorbovala iz duodenuma, a tako bi i plazmatska koncentracija i absorpcija nikotinske kiseline pasivnom difuzijom bila bi veća. Tkivna sadržina niacina i njegovih analoga NAD i NADP zavise od mnogo faktora. Jetra je mesto sa najvećom koncentracijom niacina u telu.

2.5.4 Sinteza, metabolizam i eliminacija nikotinamid nukleotid koenzima

Nikotinamid je reaktivna polovina NAD i NADP (slika br. 5 i 6) koji su koenzimi (kosubstrati) velikom broju oksidativnih i reduktivnih reakcija. Enzimi koji sadrže NAD i NADP su važne veze u seriji reakcija u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti.



Slika 5. Nikotinamid adenin dinukleotide

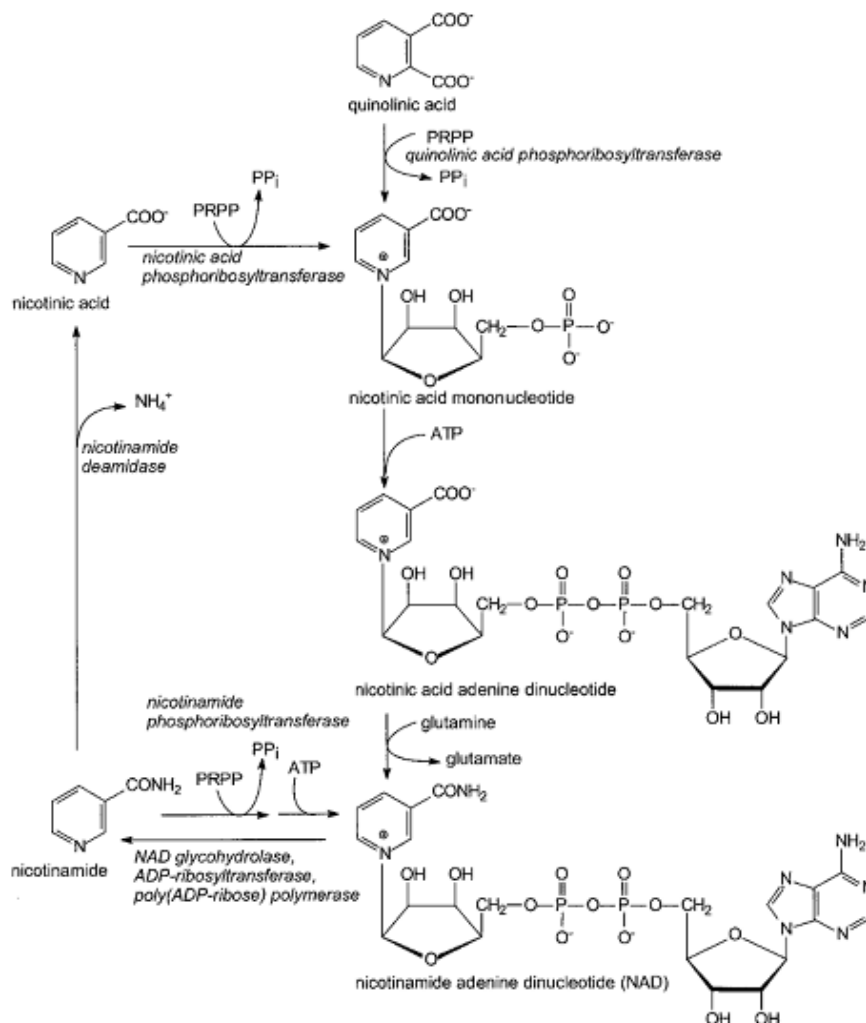


Slika 6. Nikotinamid adenin dinukleotide fosfat

Ovi koenzimi su involvirani u mehanizam transfera vodonika u živim ćelijama, uključujući više od 200 reakcija metabolizma ugljenih hidrata, masnih kiselina i amino kiselina. Najvažnije metaboličke reakcije koje katalizuju NAD i NADP su: metabolizam ugljenih hidrata (glikoliza-anaerobna i aerobna oksidacija glukoze, Krebsov ciklus), metabolizam lipida (sinteza glicerola i razlaganje glicerola, oksidacija masnih kiselina i sinteza masnih kiselina, sinteza steroida), metabolizam proteina (degradacija i sinteza amino kiselina, oksidacija ugljenih lanca putem Krebsovog ciklusa).

Koenzimi NAD-a i NADP-a mogu biti sintetizovani iz: vitamerna niacina, triptofana i hinolonske kiseline. Sinteza koenzima je prikazana na slici 7. Glavna uloga jetre je da sintetiše NAD(P) iz triptofana, preko hidrolize da bi se oslobodio niacin za iskorišćavanje u ekstra

hepatičnim tkivima. Mišići, mozak i u manjoj meri testisi su sposobni da uzmu nikotinamid iz krvotoka i da ga iskoriste bez predhodne deaminizacije.



Slika 7. Sinteza NAD-a iz nikotinske kiseline, nikotinamida i hinolona, Bender (2003)¹¹⁰.

Koenzimi nikotinamid nukleotida su katabolizovani iz četiri enzima: NAD pirofosfataze, NAD glikohidrolaze, ADP-riboziltransferaze, poli(ADP-riboza)polimeraze. U normalnim uslovima ima veoma malo ili uopšte nema urinarne ekskrecije nikotinamida ili nikotinske kiseline, jer su oba vitamera aktivno reapsorbovana iz glomerularnog filtrata. Samo kada je koncentracija veoma visoka a transportni mehanizmi zasićeni može doći do ekskrecije. N¹-metil nikotinamid i metil piridon karboksamid su glavni urinarni metaboliti nikotinamida kod ljudi, pacova i svinja.

Kod herbivora niacin najverovatnije nije metaboliziran sa metilacijom, već se izlučuje nepromenjen

2.6 Uticaj aplikacije niacina na metaboličke parametre kod krava u ranoj laktaciji.

Kod preživara je gastro-intestinalni trakt dobro adaptiran za bakterijsku fermentaciju i burag preživara je idealan prirodni ambijent za razmnožavanje mikroorganizma. Niacin ima efekat na mikrobnu populaciju i to pre svega na protozoe. Niacin je od koristi za protozoe u buragu, zato što oni nisu u stanju da sintetišu vitamin, a primećeno je značajno povećanje protozoa u ruminalnoj tečnosti nakon aplikovanja rumen nezaštićenog niacina u ishrani.^{128,133}

U literaturi su opisani različni efekti niacina na koncentraciju amonijaka u rumenu. Nađena je povećana koncentracija amonijaka nakon aplikacije niacina.^{128,134} U rezultatima Samanta i sar.(2000)¹³⁵ je nađena smanjena koncentracija amonijaka. Razvoj mikroflore obično povećava koncentraciju $\text{NH}_3\text{-N}$, pa se porast koncentracije amonijaka pod dejstvom niacina može tumačiti povećanjem protozoalne populacije pod dejstvom niacina.

Dodavanjem suplementa nikotinske kiseline Niehoff I sar. (2013)¹²⁸ dobijaju neočekivane rezultate smanjenu koncentraciju ukupnih kratkolančanih masnih kiselina (eng. Short-chain fatty acids-SCFA), dok drugi autori imaju prijavljeno signifikantno povećanje SCFA nakon dodatka nikotinske kiseline ili nikotinamida u ishrani^{135,136} ili bez efekta.^{123,137} U istraživanjima gde su primećene promene, buterna kiselina je najčešće bila promenjena, a pokazan je uticaj i na sirćetnu i propionsku kiselinu. Arambel I sar. (1986)¹³⁸ našli su interakciju između niacina i tipa obrade soje. Ukupna koncentracija SCFA povećava se po dodatku niacina u hrani koja sadrži tostiranu soju, dok se značajno smanjuje u rumenu goveda koja su hranjena netostiranom sojom. Riddell i sar.(1980)¹³⁹ primetili su značajnu redukciju SCHA u grupama koje su dobijale nikotinsku kiselinu 6 sati nakon hranjenja. Ovaj efekat nije bio signifikantan kada se uzme u obzir vremenski interval od 12 sati. Niacin nema značajni uticaj na ruminalnu digestiju hranljivih materija.¹²⁸

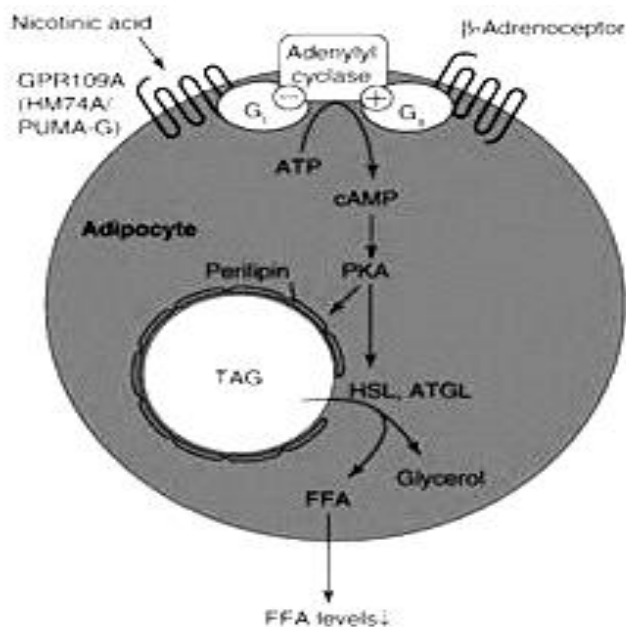
NEFA su glavne komponente triglicerida, koje se sastoje od tri masne kiseline povezane za glicerolom i glavni su depo masti u organizmu. Sa hidrolizom skladištenih triglicerida (masti) preko hormon osetljive lipaze u masnom tkivu, oslobađa se NEFA i glicerol. Plazmatska koncentracija NEFA je povišena kod mlečnih krava za vreme peripartalnog perioda. Krava

mobiliše masne kiseline iz adipoznog tkiva kao odgovor metaboličkih promena i negativnog energetskeg bilansa šta je karakteristično za peripartalni period kod mlečnih krava. Visoki influks NEFA u jetru je veći od njegovog oksidativnog kapaciteta što rezultira sa skladištenjem NEFA kao triglicerida u hepatocitima i u mišićima. Ovakve promene dovode do depresije u uzimanju hrane i metaboličkih promena.

U preglednom radu Niehofa i sar. (2009)¹⁴⁰ u kome se analiziraju studije u kojima se koristi niacin koji nije zaštićen od razgrađivanja u rumenu došlo se do zaključka da vrednosti NEFA mogu biti smanjeni usled dejstva nikotinske kiseline pod određenim uslovima ali ne i od nikotiamida. Nakon prestanka efekta nikotinske kiseline dešava se povratak NEFA iznad bazalnih vrednosti koje se zatim vraćaju u normalu. Da bi se postigao efekat niacina količina niacina koja pristiže u duodenum mora biti na visokom nivou, što se može postići dodatkom niacina u ishrani u velikim farmakološkim dozama. U veoma visokoj dozi nikotinska kiselina ima sposobnost da suprimira oslobađanje masti iz depoa.⁶

Antilipolitički efekat nikotinske kiseline poznat je još od 1963.g.a ispitivan je i dokazan kod adipoznog tkiva pacova.¹⁴¹ Danas je identifikovan njegov celularan receptor, GPR109A (analogan humanom HM74A i mišjem PUMA-G).^{113,142} Visok afinitet HM74A za nikotinsku kiselinu je razlog za terapijski efekat nikotinske kiseline preko inhibicije adenil ciklaze i redukcije intracelularnog nivoa cAMP u adipocitima (slika 8). *In vivo* studije pokazuju da aplikacija farmakoloških doza nikotinske kiseline smanjuje nivo plazmatske NEFA tako što inhibiše lipolizu kod goveda.^{5,6,143} Ovakav antilipolitički potencijal nikotinske kiseline najverovatnije se ostvaruje preko delovanja na niacinski receptor GPR109A (Slika 8).^{144,145} Nedavno je dokazano da GPR109A antilipolitički put, koji je već opisan kod drugih vrsta životinja, postoji u funkcionalnoj formi i kod goveđeg tkiva u *in vitro* uslovima.¹⁴⁶ Sa druge strane nikotinamid ima veoma mali afinitet vezivanja sa GPR109A.¹⁴⁴ Aktivacija GPR109A sa nikotinskom kiselinom dovodi do inhibicije aktivnosti adenalin ciklazete do smanjenja koncentracije cAMP u ćelijama. Smanjen cAMP u adipocitima dovodi do posledične inaktivacije protein kinaze A i smanjenja fosforilacije hormon osetljive lipaze i time do redukcije lipolize.¹⁴⁴ Receptor GPR109A ima u adipoznom tkivu i imunim ćelijama, kod goveda su pronađeni i u mišićima, mozgu, i jetri.¹⁴⁷ Endogeni ligand kod ljudi za GPR109A je BHB, a nikotinamid reaguje kao slab agonist i nema sposobnost da promeni lipidni profil u plazmi.¹⁴⁸ Kod goveda GPR109A ligand, nikotinska kiselina, nikotinamid i BHB, pokazali su različiti nivo efikasnosti u

indukovanoj antilipolizi u *in vitro* uslova.¹⁴⁶ Nikotinska kiselina smanjuje fosforilacijuhormon senzitivne lipaze i tako redukuje lipolitički odgovor, nikotinamid nije sposoban da suprimira lipolitičku aktivnost kod goveđeg tkiva u *in vitro* uslovima, a BHB samo u najvećoj koncentraciji indukuje značajno smanjenje u oslobađanju glicerola i fosforilaciju hormon senzitivne lipaze.¹⁴⁶



Slika 8. Mehanizam smanjena lipolize izazvane niacinom – Aktivacija GPR109A preko nikotinske kiseline dovodi do inhibicije aktivnosti adeniln ciklaze i potom do smanjenja koncentracije cAMP u ćelijama. Smanjenje cAMP u adipocitima dovodi do posledične inaktivacije protein kinaze A i smanjenja fosforilacije hormon osetljive lipaze i time do redukcije lipolize.¹⁴⁵

Pires i Grummer (2007)⁷⁶ aplikovali su abomazalnu infuziju u različitim dozama nikotinske kiseline (0, 6, 30, 60 mg/kg telesne težine) kod Holštajn krava, koje su bile u restriktivnom režimu ishrane. Abomazalna infuzija je bila aplicirana kao pojedinačna bolus doza 48 sati nakon početka restrikcije hranom. Koncentracija plazmatske NEFA bila je smanjena od 546 $\mu\text{Eq/l}$ na 208 $\mu\text{Eq/l}$ jedan sat po aplikaciji abomazalne infuzije od 6 mg nikotinske kiseline po kg/tm i manje od 100 $\mu\text{Eq/L}$ za 3 sata posle abomazalne infuzije dveju najviših doza nikotinske kiseline. Rezultati pokazuju da se drastično vraćanje koncentracija NEFA odvija po prekidanju infuzije sa nikotinskom kiselinom. Vraćanje se odvija nakon inicijalnog smanjenja koncentracija NEFA u plazmi i taj povratak je trajao 9 časova za dozu od 30 mg/kg nikotinske

kiseline, odnosno 6 časova za dozu od 6 mg/kg nikotinske kiseline. Time su Pires i Grummer (2007)⁷⁶ dokazali da je nikotinska kiselina moćan antilipolitički agens kod goveda, koji imaju negativan energetska bilans za vreme restrikcije hranom i da održivo smanjenje NEFA može se postići sve dok ima dotoka nikotinske kiseline u donjem delu gastrointestinalnog trakta gde se može absorbovati. Antilipolitička svojstva nikotonske kiseline mogu pokazati kao korisni kod mlečnih krava ukoliko se niacin koristi u optimalnoj dozi i formi i obezbedi se postruminalni izvor nikotinske kiseline. Ipak, prvo treba utvrditi optimalnu dozu nikotinske kiseline koja će imati umereni stepen inhibicije lipolize i NEFA, zato što NEFA koja potiče iz masnog tkiva predstavlja važan izvor energije i prekursor za sintezu masnih kiselina u početku laktacije te kako obezbediti stabilan izvor nikotinske kiseline da bi se izbeglo dramatično vraćanje NEFA. U istraživanju Morey I sar. (2011)⁵ gde se koristio niacin zaštićen od razgrađivanja u rumenu, doza od 24 grama inkapsuliranog niacina (koja obezbeđuje 9.6 grama na dan biorasplošljivost) pokazalo se uspešnim u inhibiciji lipolize kod postpartalnih krava, jer se smanjenjem koncentracija postpartalne vrednosti NEFA. Isto tako Morey I sar. (2011)⁵ ukazuju na to da protokoli tretmana koji se upotrebljavaju u njuhovoj studiji su jedini koji jasno supresiraju lipolizu kod goveda bez prouzrokovanja povratne lipolize. Doza od 12 grama dnevno inkapsuliranog niacina obezbeđuje biorasplošljivi izvor niacina koji modifikuje lipidni metabolizam.⁴

Samo povećana koncentracija nikotinske kiseline u krvi može izazvati smanjenje nivoa fosforilacije hormona senzitivne lipaze i prevenirati povišeni nivo lipolize pa tako smanjiti nivo plazmatske NEFA.^{5,146,149} Aplikacija nikotinske kiseline ali ne i nikotinamida može imati pozitivne efekte kod krava u tranzicionom periodu.

Iako postoji visok influks NEFA u hepatocite kod krava u ranoj laktaciji, nađena je smanjenja koncentracija triglicerida u jetri kod krava hranjenih sa zaštićenim niacinom. Pošto je akumulacija hepaticnih triglicerida direktno povezana sa koncentracijom NEFA u krviredukcijom koncentracije NEFA kod krava hranjenih niacinom postpartum moguće je dovesti do smanjene akumulacije triglicerida.⁴

Pored masne jetre, nastanak ketoze predstavlja drugu negativnu posledicu visoke koncentracije NEFA i njegovog nekompletnog metabolisanja, kada nastaju ketonska tela. Jedna od metoda prevencije ketoze je davanje suplemenata niacina i upotreba niacina zajedno sa prekursorima glikogena kao propilen glikol ili natrijum propionat.^{149,150} Istraživanja su pokazala

da suplementi niacina redukuju koncentraciju BHBA i NEFA u krvnoj plazmi sa povećanjem nivoa glukoze u serumu.^{151,152} Erikson i sar. (1992)¹⁵³ su dobili rezultate sa signifikantnim efektima niacina na BHB gde je nivo koncentracije BHB u plazmi bilo niže kod krava hranjenih sa niacinom u odnosu sa kontrolnu grupu. Signifikantnu redukciju ($p < 0.01$) koncentracije BHB je dobijeno kod krava hranjenih sa niacinom (u formi kristalnog pudera) 12 grama po kravi dnevno i smanjenje u manjoj meri kod krava koji su dobili 6 grama po kravi na dan ako se upoređi sa kontrolnom grupom.¹⁵⁴

Insulinska rezistencija kod krava u peripartalnom periodu nastaje zbog prioritete upotrebe glukoze za rast ploda, razvoj vimena i laktaciju. Insulinska rezistencija kod Hoštajn krava je povezana i sa povećanom koncentracijom NEFA u plazmi.⁷⁵ Obzirom da niacin pomaže u smanjenju lipolize i podiže glikemiju, može povećati lučenje i efikasnost insulina i smanjiti insulinsku rezistenciju.

Kod nekih ispitivanja nisu pronađeni značajni efekti tretmana ili vremena tretmana na glukozu u krvi kod krava kod kojih je aplikovan nezaštićeni^{137,155} ili zaštićeni niacin.^{4,5} Podaci prijavljeni od Thornton i Schultz (1980)¹⁵⁶ su pokazali promenjen metabolizam glukoze za vreme aplikovanja farmakološke doze nikotinske kiseline kod preživara i to: povećanje koncentracije glukoze i insulina u plazmi, redukciju tolerancije na glukozu i rezistenciju na insulin. Značajno povećanje koncentracije glukoze u krvi su dobili Di Costanzo i sar.(1997)¹¹⁵ nakon aplikacije nikotinske kiseline u dozi 36 grama po kravi na dan. Ovakvo povećanje može da indukuje poboljšanu glukoneogenetsku aktivnost na ćelijskom nivou promovisanu od strane parcijalne supresije lipogeneze prouzrokovane od nikotinske kiseline.

Krave koje su primale ograničene obroke i koje su primale farmakološku dozu nikotinske kiseline kao abomazalnu infuziju, imale su povećanu koncentraciju insulina i 4-8 časa nakon prestanka aplikacije nikotinske kiseline. Koncentracija glukoze je povećana i za vreme povratka koncentracije NEFA na viši nivo u krvnoj plazmi, dok koncentracija insulina sledi sličan model kao koncentracija NEFA u vreme povratne faze.⁷⁶ Pires i sar.(2007)⁶ ukazuju na to da niža koncentracija NEFA koje je postignuta sa aplikacijom nikotinske kiseline kod holštajn goveda na restriktivnoj ishrani, poboljšava odgovor insulina i iskorišćenje glukoze sa povećanjem insulinske senzitivnosti, implicirajući na to da je NEFA u krvi važan faktor za nastanak insulinske rezistencije kod mlečnih krava za vreme negativnog energetskog bilansa. Ovakvi rezultati su podržani od studije sprovedenih kod ljudi kod kojih se upotrebljava acipimox

(nikotinska kiselina dugog dejstva) kada dolazi doredukovanja NEFA u krvi, do poboljšanog odgovora na oralni glukoza tolerantan test do poboljšanja insulinom stimulisano iskorišćavanja glukoze od perifernih tkiva za vreme izvođenja hiperinsulinemijskog euglikemijskog klampa. 157,158

Niacin značajno utiče na koncentraciju glukoze. Povećanje koncentracije glukoze je bilo zavisno od koncentracije niacina i dužine tretmana. Pescara i sar. (2010)¹⁹⁵ navode da je nejasan mehanizam kojim nikotinska kiselina povećava koncentraciju glukoze u plazmi je, a to može biti rezultat povećane hepaticne produkcije glukoze, smanjenog klirensa glukoze iz krvi ili oboje. Koncentracija insulina u krvi imala je sličnu dinamiku kretanja kao glukoza. Povećanje koncentracije glukoze bilo je primećeno kao odgovor na davanje infuzije sa nikotinskom kiselinom 10. i 12. dana i ovo povećanje je trajalo jedan dan po prekidu tretmana, a za vreme tretmana nikotinskom kiselinom primećeno je bilo i povećanje koncentracije insulina u krvi.¹⁴³ Titgemeyer i sar. (2011)¹⁴³ navode da je teško uvideti da li povećanje vrednosti glukoze dovodi do povećanja insulina ili insulinska rezistencija dovodi do povećanja glukoze, a njihov model se ne slaže s tim da je povećanja koncentracije NEFA povezana sa insulinskom rezistencijom za vreme tretmana sa nikotinskom kiselinom.

Ovakvi različiti rezultati delimično se mogu objasniti sa različitim nivom snabdevanja sa energijom i stepenom lipolize, i može se zaključiti da je insulin uključen u uticaj niacina sa glukozom u krvi. Koncentracija glukagona u studiji Titgemeyer i sar. (2011)¹⁴³ nije bila značajno izmenjena što pokazuje na to da je njegova uloga veoma mala ili uopšte je nema u efektu nikotinske kiseline na glikozu u krvi.

2.7 Efekti niacina na laktacione performanse

U samo dva istraživanja su ispitivane koncentracije niacina u mleku kod krava.^{160,161} Wagner i sar. (1997)¹⁶¹ pronašli su samo nikotin amid, dok su Nilson I sar.(1967)¹⁶⁰ ispitivali ukupnu količinu niacina i nisu uradili razliku između vitamera. Sadržaj nikotina amida u mleku je bio poboljšan sa dodatkom suplementa sa nikotinskom kiselinom, ali najviša aplicirana doza niacina rezultirala je najnižom koncentracijom niacina u mleku. Ruminalna koncentracija niacina isto tako je bila izmerena ali nije nađena veza između koncentracije niacina u rumenu i koncentracije niacina u mleku.

U mnogim studijama je vršeno ispitivanje prinosa mleka kod mlečnih krava nakon dodavanja suplemenata niacina prijavljeno je da proizvodnja mleka nije bila značajno izmenjena i pored toga što je koncentracija niacina u plazmi bila povišena.^{115,153,124,162} Objašnjenje izostanka efekta niacina na mlečnost je ta što su krave u pojedinim studijama bile u pozitivnom energetsom bilansu i u različitim fazama laktacije. Karakoodi i Tamizrad (2009)¹⁵² ukazuju na to da je niacin najefikasniji ukoliko se upotrebljava kod krava u ranoj laktaciji i u njihovoj studiji krave koji su bile u ranoj laktaciji i kojima je bilo suplementirano 14 grama niacina imale su bolji prinos mleka od kontrolne grupe. U drugim studijama^{163,164} nađeno je povećanje prinosa mleka nakon dodatka suplemenata niacina u ishrani, a u ispraživanju Cervantesa I sar.(1996)¹⁶³ nađeno je povećanje koncentracije nikotinamida u plazmi i povećanje prinosa mleka.

U ispitivanjima gde se koristilo 12 grama na dan niacina zaštićenog od ruminalnog ragrađivanja nisu bila primećena poboljšanja u prinosu mleka.^{4,5}

Tretman niacinom nije imao efekat na komponente mleka, procenat proteina u mleku, prinos proteina u mleku i prinos masti u mleku.^{4,5} U ispitivanjima Yuana i sar.(2012)⁴ gde se koristio inkapsulirani niacin kao suplement došlo je do redukcije procenta masti u mleku i primećena je tendencija značaja za interakciju tretman×vreme ($p < 0.1$) za prinos masti u mleku. Ovi autori navode da dobijeni podaci podržavaju koncept da niacin blokira mobilizaciju masnih kiselina i zato redukuje gubitak energije preko mleka postpartalno.

3. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Na osnovu pregleda literature, izneli smo sledeće hipoteze i ciljeve rada:

1. Aplikacija niacina dovodi do značajnih promena u vrednosti NAD i NADP u krvi krava koji su vitamini ovog vitamina
2. Aplikacija niacina smanjuje lipidnu mobilizaciju i ketogenezu i manju akumulaciju lipida u jetri
3. Aplikacija niacina dovodi do smanjenja intenziteta opadanja vrednosti insulina i glukoze i smanjuje insulinsku rezistenciju u ranoj laktaciji
4. Aplikacija niacina dovodi do promena u vrednosti metaboličkih parametara kod krava, posebno onih koji se odnose na funkcionalni status hepatocita
5. Aplikacija niacina smanjuje zavisnost metaboličke adaptacije od homeoretskih procesa lipolize i insulinske rezistencije
6. Upotreba NAD i NADP može biti od koristi kada se procenjuje uticaj statusa niacin na metaboličku adaptaciju kod krava
7. Krave sa boljim statusom niacina u ranoj laktaciji imaju manji stepen akumulacije lipida u jetri

4. MATERIJAL I METODE

Ogled 1 – Uticaj aplikacije niacina na vrednost njegovih vitamera, lipidni profil i metabolički status krava u ranoj laktaciji

Krave i menadžment - Ogled je izvršen na 30 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, bez znakova poremećaja zdravlja, uz proizvodnju mleka 7500 ± 950 litara. Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali su u tranzicionom periodu bile u porodilištu, gde je postojao vezani sistem. Ishrana krava je obročna, dok je u porodilištu posle partusa bila po volji. Krave su hranjene miksovanim obrokom, kojim se zadovoljavaju kompletne potrebe krava. Krave uzimaju vodu ad libitum. Obrok za krave u ranoj laktaciji se pravi da zadovolji sledeće standarde: proteini (17,5-19,5% SM sirovih proteina, 30-33% razgradivih proteina od ukupnih, 35-40% nerazgradivih proteina od ukupnih); ugljeni hidrati (ADF minimum 17-21%, NDF minimum 28-31%, NDF iz kabaste hrane minimum 18-23%, nestrukturani ugljeni hidrati 35-42%, nivo suve materije iz kabaste hrane minimum 40-45%); energija (NEL 7-7,4 MJ/kg suve materije obroka); masti u obroku 5-7%.

Aplikacija niacina – Niacin je aplikovan putem hrane *per os*. Korišćen je Rovimix® Niacin u dozi koja omogućuje dostupnost u crevima oko 6-12g niacina/dan (60-120g krava/dan u hrani), što se u predhodnim istraživanjima pokazalo kao optimalna biološka koncentracija. Niacin je aplikovan u periodu dve nedelje pre i dve nedelje posle teljenja.

Uzorkovanje krvi – Krv je uzimana venepunkcijom *v.coccigea* kod krava u periodu pre jutarnjeg hranjenja kako bi se izbegao prandijalni efekat na vrednost metabolita. Krv je uzeta u momentu teljenja, potom jednu i dve nedelje nakon teljenja. Dodatno je krv uzeta i pre početka davanja niacina kako bi se ispitali vitamini ovog vitamina u krvi i njihove promene tokom vremena. Uzorci krvi za ispitivanje biohemijskih parametara su sakupljeni u desetomilitarske epruvete sa gel separatorom (BD Vacutainer® SST II Advance, BD Plymouth, UK) koji u sebi sadrži silikon koji je activator koagulacije i gel koji predstavlja barijeru između koaguluma i seruma nakon centrifugiranja. Vakutajner epruvete sa gel separatorom su centrifugirane na 4000 obrtaja u trajanju od 10 minuta, kako bi se u potpunosti izdvojio serum. Svaka vakutajner epruveta sa uzorcima krvi je obeležena zbog sledljivosti uzoraka, a potom i zaštićena od

direktnog delovanja sunčeve svetlosti, postavljena na suvi led i transportovane su u laboratoriju. Krv je uzimana paralelno i u litijum-heparinske vakutajnere, za potrebe analize NAD i NADP.

Određivanje parametara u krvi – Korišćene su fotometrijske reakcije i fotometar proizvođača *Rayto (RT1904c)*. Fotometriranje je vršeno prema specifikaciji proizvođača. Pre upotrebe svakog novog kita formirana je kalibraciona kriva, prema specifikaciji proizvođača. Korišćeni su standardni kitovi proizvođača *Randox (UK)* i/ili *Pointe scientific (USA)*. U kitovima su obezbeđene prečišćene i standardizovane hemikalije značajne za odvijanje reakcija, koje su opisane u daljem tekstu. Ostale hemikalije koje su bile potrebne, a nisu uključene u kitove su bile od proizvođača *Sigma Aldrich*. Insulin je određen pomoću sendvič ELISA kita proizvođača *Cusabio*. Korišćen je ELISA čitač marke *Rayto*.

Određene su vrednosti sledećih parametara u krvi: NAD, NADP, odnos NAD/NADP (dobija se prostim deljenjem predhodna dva parametra), insulin, glukoza, NEFA, BHB, trigliceridi, holesterol, MDA, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT, ukupni proteini, albumini, urea, Ca i P.

NAD i NADP su određeni pomoću kolorimetrijske ELISA metode iz lizata eritrocita. Standardni kitovi sadrže specifične enzime (cycling enzyme mix) koji prepoznaju NAD odnosno NADP, pa nije potrebna njihova predhodna purifikacija. Rezultati su izraženi kao pmol/10⁶eritrocita. Ovaj broj eritrocita se nalazi u jednom mikrolitru krvi, a kada se rezultat pomnoži sa 100 dobijamo vrednost NAD odnosno NADP koji se nalazi u jednom ml. Korišćeni su kitovi proizvođača *Abcam*. Odnos NAD/NADP je izračunat prostim deljenjem dva broja.

NEFA – Reakcijom se zasniva na acilaciji koenzima A od strane masnih kiselina u prisustvu dodane acil-CoA sintetaze kao katalizatora. Acil-CoA se oksidiše pod dejstvom dodate acil-CoA oksidaze uz proizvodnju vodonik peroksida. Vodonik peroksid u prisustvu peroksidaze dozvoljava oksidativnu kondenzaciju 3-metil-N-etil-N(β-hidroksietil)-anilina (MEFA) sa 4-aminoantipirinom, što da je ljubičastu boju.

BHB – Određivanje BHB se bazira na njegovoj oksidaciji do acetoacetata pomoću enzima 3-hidroksibutirat dehidrogenaze. Istovremeno sa ovim kofaktor NAD⁺ se redukuje do NADH, što dovodi do razvoja boje.

Glukoza – Određivanje glukoze vrši se posle njene enzimatske oksidacije u prisustvu glukoza-oksidaze. Dobijeni vodonik-peroksid u ovoj reakciji daje reaguje sa 4-aminofenazonom

i fenolom u prisustvu peroksidaze kao katalizatora. Dobija se crveno-ljubičasta boja čiji se intenzitet meri.

Holesterol – Holesterol se određuje posle enzimatske hidrolize holesterol estera pod dejstvom holesterol esteraze, kada se dobija holesterol i masne kiseline. Izdvojeni holesterol se oksidiše pod dejstvom dodate holesterol-oksidge, kada se formira vodonik-peroksid. Vodonik peroksid reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom pod dejstvom peroksidaze dajući obojeni kvinoneimin.

Trigliceridi – Trigliceridi se određuju enzimatskom reakcijom. Trigliceridi pod dejstvom lipaza daju glicerol i masne kiseline. Dobijeni glicerol sa ATP-om pod uticajem glicerol kinaze daje glicerol-3-fosfat, koji dalje oksidiše pod dejstvom dodate glicerol-3-fosfat oksidge. Produkt ove reakcije je vodonik peroksid koji sa 4-aminofenazonom i 4-hlorofenolom pod dejstvom peroksidaze daje obojeni kvinoneimin.

Ukupni bilirubin – Bilirubin vezan za proteine se najpre odvoji pod delovanjem deterdženata. Ukupni bilirubin reaguje sa 2,4-dihloroanilin-om u prisustvu hidrohlorne kiseline, dajući obojeni azobilirubin.

AST – AST je enzim koji katalizuje transfer amino-grupe sa L-aspartata na α -ketoglutarat, kada se dobija L-glutamat i oksalacetat. Oksalacetat sa NADH i H pod dejstvom malat-dehidrogenaze kao katalizatora daje obojeni L-malat i NAD^+ .

ALT – ALT je enzim koji katalizuje transfer amino-grupe sa L-alanina na α -oksoglutarat, kada se dobija L-glutamat i piruvat. Piruvat sa NADH i H pod dejstvom laktat-dehidrogenaze kao katalizatora daje obojeni L-laktat i NAD^+ .

GGT – Gama-glutamyltransferaza je enzim koji katalizuje reakciju između L- γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilidin-a i glicilglicina, kada se dobija obojeni 5-amino-2-nitrobenzoat.

Ukupni proteini – Proteini u serumu reaguju sa bakarnim jonom i u alkalnom rastvoru daju ljubičasti bojeni kompleks. Intenzitet ljubičaste boje je proporcionalan koncentraciji proteina.

Albumini – Albumini vezani za bromkrezol zeleno daju intenzivno zeleno bojenje proporcionalno koncentraciji albumina.

Urea – Urea u vodi pod dejstvom ureaze daje amonijum jon i ugljenik-četiri oksid. Amonijum jon reaguje sa salicilatom i hipohloritom dajući kompleks zelene boje.

Malondialdehid (MDA) – MDA se kvantifikuje u kontrolisanoj kolorimetrijskoj reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom, kada se formira obojeni kompleksi.

Kalcijum (Ca) – Kalcijumov jon daje ljubičasti kompleks sa O-krezolftalein kompleksom u alkalnoj sredini, na čemu se zasniva reakcija.

Fosfor (P) – Neorganski fosfor reaguje sa amonijum molibdatom u prisustvu sulfurične kiseline i formira obojeni fosfomolibdat kompleks, kada se meri kolorimetrijska reakcija.

Insulin – Određivanje koncentracije insulina vrši se pomoću sendvič ELISA metode. Antitela specifična za insulin nalaze se inkorporirana u sloj kojim je prekrivena mikrotitar ploča. Standard i uzorci se pipetiraju u polja. Inkubira se 2 sata na 37°C, a potom se odliva višak tečnosti iz svakog polja bez ispiranja. Zatim se u svako polje dodaju biotinom obeležena antitela i inkubira se 1 sat na 37°C. Po isteku vremena vrši se aspiracija i ispiranje tri puta. Dodaje se enzim HRP-avidin (Horseradish Peroxidase) i inkubira se 1 sat na 37°C. Aspirira se i pere 5 puta. Dodaje se TMB (tetrametilbenzidin) supstrat i inkubira 15-30 minuta na 37°C. U ovom periodu ploča se mora zaštititi od svetlosti, jer se razvija kolorimetrijska reakcija. Potom se dodaje stop rastvor (kiselina) i vrši očitavanje. Intenzitet boje zavisi od količine insulina koja se vezala za antitela tokom inicijalnih koraka, te obeleženih antitela koja su se potom vezala za insulin. Očitavanje treba vršiti tokom 5 minuta.

Izračunavanje indeksa insulinske rezistencije - Ispitivanje insulinske rezistencije određeno je pomoću tri indikatora insulinske rezistencije: RQUICKI i RQUICKI-BHB. Korišćene su sledeće formule za izračunavanje ovih indikatora:

$G:I$ (odnos glukoze i insulina) = glukoza mmol/l / insulin μ U/ml

$RQUICKI = 1 / [\log(\text{glukoza mg/dL}) + \log(\text{insulin } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{NEFA mmol/l})]$

$RQUICKI-BHB = 1 / [\log(\text{glukoza mg/dL}) + \log(\text{insulin } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{NEFA mmol/l}) + \log(\text{BHB mmol/l})]$

Statistička analiza i modeli – Ispitana je razlika u koncentraciji metabolita u grupi krava koja je primala i koja nije primala niacin u svakoj nedelji posebno. Ispitana je razlika u vrednosti NAD, NADP i NAD/NADP odnosa kod krava koje su primale i koje nisu primale niacin, da bi se utvrdilo da li se ovi indikatori mogu utvrditi u proceni statusa niacina u organizmu krava. Korišćena je ANOVA analiza sa naknadnim LSD testom. Izračunata je u površina ispod krive za NAD i NADP kod obe grupe krava. Potom je ispitano da li postoji korelacija ispitanih metaboličkih parametara sa NAD, NADP i NAD/NADP, kao i međusobna korelacija ispitanih

parametara pomoću Pirsonovog koeficijnta korelacije. Da bi se utvrdila povezanost metaboličkih parametara sa stepenom lipolize i ketogeneze u funkciji statusa niacina izračunati su koeficijenti parcijalne korelacije.

Ogled 2 – Ispitivanje povezanosti morfometrijskih karakteristika hepatocita, adipocita i vitamerna niacina kod krava isključenih iz proizvodnje tokom rane laktacije

Kod 10 krava neposredno pre klanja izvađena je krv i određena vrednost NAD, NADP i NAD/NADP odnos, kao što je predhodno opisano. Krave su isključene u ranoj laktaciji i bile su optimalne telesne kondicije.

Sa linije klanja je uzet uzorak parenhima jetre i uzorak potkožnog masnog tkiva sa regije kukova (mesto koji služi za određivanje telesne kondicije). Dobijeno tkivo je fiksirano pa obojeno Hematoksilin-eozinom i Sudanom, prema standardnim procedurama. Od svakog uzorka je napravljen po jedan preparat. Kada su preparati napravljeni na svakom je vršena analiza 100 slučajno odabranih hepatocita i adipocita. Ispitan je dijametar jedra i masnih kapljica u hepatocitima kao i njihova optička gustina. Kod adipocita je ispitan dijametar i optička gustina. Merenje je vršeno ImageJ softverom, a kalibracija je vršena na mikroskopu. Stereološke procedure su izvedene u skladu sa principima koje je opisao Reid (1980).

Statistička analiza: Ispitana je međusobna povezanost morfometrijskih parametara adipocita i hepatocita kao i njihova povezanost sa NAD, NADP i NAD/NADP. Korišćena je Spearman-ova korelacija.

5.REZULTATI

Ogled 1 – Uticaj aplikacije niacina na vrednost njegovih vitamera, lipidni profil i metabolički status krava u ranoj laktaciji

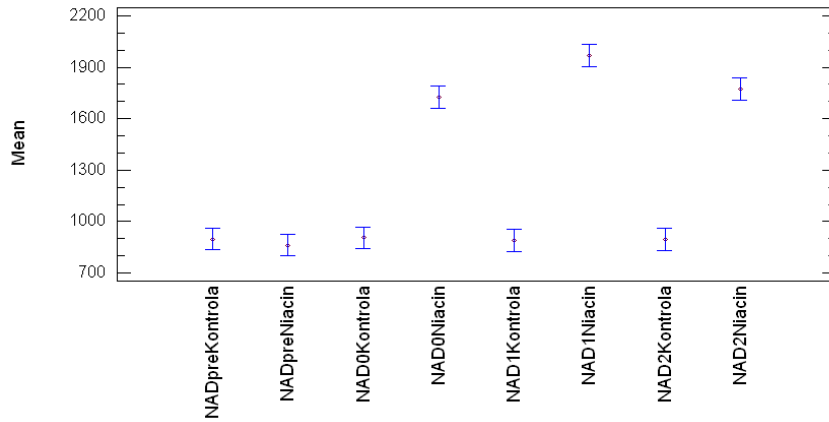
5.1 Uticaj aplikacije niacina na vrednost njegovih vitamera u krvi

Vrednost NAD bila je u rasponu od 860 do 895 pmol/mL u kontrolnoj grupi bez obzira na nedelju ogleada. Vrednost NAD kod krava koje su primale niacin iznosila je u nedelji teljenja (0 nedelja) 1724,6 pmol/L, u prvoj nedelji po teljenju 1968,6pmol/mL i u drugoj nedelji po teljenju 1771,8 pmol/L. Analiza varijanse i LSD test pokazuju da su krave koje su primale niacin imale značajno višu koncentraciju NAD u svim nedeljama ispitivanja ($F=112,8$; $p<0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu iste nedelje, kao i u odnosu na period pre aplikacije niacina. Deskriptivne vrednosti, ANOVA analiza i LSD test prikazani su u tabelama 1 - 3 i Grafikonima 1 i 2. NAD je pokazao blagi trend opadanja po teljenju u kontrolnoj grupi.

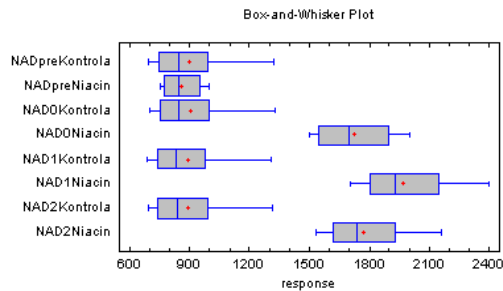
Tabela 1: Deskriptivni parametri za vrednost NAD kod krava u ogleđnoj i kontrolnoj grupi (pmol/mL)

	<i>Count</i>	<i>Average pmol/L</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
NADpreKontrola	15	898,3	183,3	20,4%	695,1	1320,69	625,59
NADpreNiacin	15	862,3	90,2	10,4%	750,0	1000,0	250,0
NAD0Kontrola	15	904,6	184,6	20,4%	700,0	1330,0	630,0
NAD0Niacin	15	1724,6	180,4	10,46	1500,0	2000,0	500,0
NAD1Kontrola	15	889,3	181,4	20,4%	688,1	1307,48	619,334
NAD1Niacin	15	1968,6	207,1	10,5%	1705,0	2400,0	695,0
NAD2Kontrola	15	895,6	182,7	20,4%	693,0	1316,7	623,7
NAD2Niacin	15	1771,8	186,4	10,5%	1534,5	2160,0	625,5
Total	120	1239,4	489,1	39,4%	688,1	2400,0	1711,85

Grafikon 1: NAD srednja vrednost \pm SD za ispitivane grupe krava



Grafikon 2 i Tabela2: ANOVA analiza – uticaj aplikacije niacin i momenta uzimanja krvi na vrednost NAD



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	2,49305E7	7	3,5615E6	112,88
Within	3,53382E6	112	31551,9	
Total	2,84643E7	119		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 0,955148
P-Value = 0,4676

Tabela 3: Naknadni LSD test za ANOVA analizu za vrednost NAD

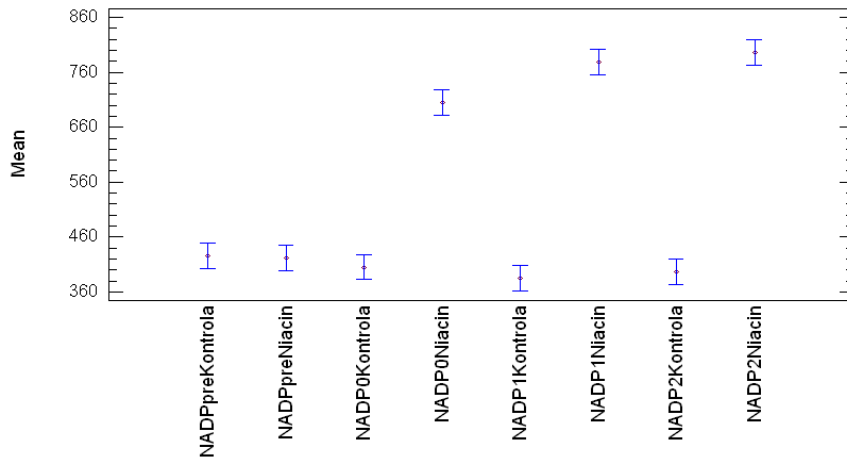
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Differen ce</i>
NADpreKontrola - NADpreNiacin		36,0007
NADpreKontrola - NAD0Kontrola		-6,33267
NADpreKontrola - NAD0Niacin	p<0,01	-826,333
NADpreKontrola - NAD1Kontrola		8,98334
NADpreKontrola - NAD1Niacin	p<0,01	-1070,33
NADpreKontrola - NAD2Kontrola		2,714
NADpreKontrola - NAD2Niacin	p<0,01	-873,466
NADpreNiacin - NAD0Kontrola		-42,3333
NADpreNiacin - NAD0Niacin	p<0,01	-862,333
NADpreNiacin - NAD1Kontrola		-27,0173
NADpreNiacin - NAD1Niacin	p<0,01	-1106,33
NADpreNiacin - NAD2Kontrola		-33,2867
NADpreNiacin - NAD2Niacin	p<0,01	-909,467
NAD0Kontrola - NAD0Niacin	p<0,01	-820,0
NAD0Kontrola - NAD1Kontrola		15,316
NAD0Kontrola - NAD1Niacin	p<0,01	-1064,0
NAD0Kontrola - NAD2Kontrola		9,04667
NAD0Kontrola - NAD2Niacin	p<0,01	-867,133
NAD0Niacin - NAD1Kontrola	p<0,01	835,316
NAD0Niacin - NAD1Niacin	p<0,01	-244,0
NAD0Niacin - NAD2Kontrola	p<0,01	829,047
NAD0Niacin - NAD2Niacin		-47,1333
NAD1Kontrola - NAD1Niacin	p<0,01	-1079,32
NAD1Kontrola - NAD2Kontrola		-6,26934
NAD1Kontrola - NAD2Niacin	p<0,01	-882,449
NAD1Niacin - NAD2Kontrola	p<0,01	1073,05
NAD1Niacin - NAD2Niacin	p<0,01	196,867
NAD2Kontrola - NAD2Niacin	p<0,01	-876,18

Vrednost NADP bila je u rasponu od 385,09 do 425,62 pmol/mL u kontrolnoj grupi bez obzira na nedelju oglada. Vrednost NADP kod krava koje su primale niacin iznosila je u nedelji teljenja (0 nedelja) 704,45 pmol/L, u prvoj nedelji po teljenju 778,36 pmol/L i u drugoj nedelji po teljenju 796,18 pmol/L. Analiza varijanse i LSD test pokazuju da su krave koje su primale niacin imale značajno višu koncentraciju NAD u svim nedeljama ispitivanja (F=126,79; p<0,001) u odnosu na kontrolnu grupu iste nedelje, kao i u odnosu na period pre aplikacije niacina. Deskriptivne vrednosti, ANOVA analiza i LSD test prikazani su u tabelama 4 - 6 i Grafikonima 3 i 4. NADP pokazao trend opadanja po teljenju u kontrolnoj grupi.

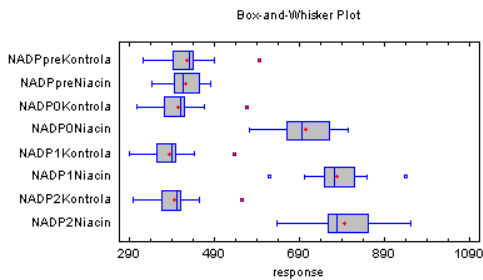
Tabela 4: Deskriptivni parametri za vrednost NAD kod krava u ogednoj i kontrolnoj grupi pmol/mL

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
NADPpreKontrola	15	425,624	65,7802	15,455%	323,4	595,004	271,604
NADPpreNiacin	15	422,67	39,9819	9,45936%	342,858	482,61	139,752
NADP0Kontrola	15	405,356	62,6478	15,455%	308,0	566,67	258,67
NADP0Niacin	15	704,45	66,6364	9,45936%	571,43	804,35	232,92
NADP1Kontrola	15	385,089	59,5163	15,4552%	292,6	538,34	245,74
NADP1Niacin	15	778,361	70,3376	9,03662%	620,69	941,18	320,49
NADP2Kontrola	15	397,249	61,3957	15,4552%	301,84	555,34	253,5
NADP2Niacin	15	796,18	75,7706	9,51682%	636,43	950,4	313,97
Total	120	539,372	184,131	34,138%	292,6	950,4	657,8

Grafikon 3: NAD srednja vrednost±SD za ispitivane grupe krava



Grafikon 4 i Tabela 5: ANOVA analiza za koncentraciju NADP



ANOVA Table				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	3,56253E6	7	511790	126,79
Within	462073	112	4036,37	
Total	4,0346E6	119		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 0,480884
P-Value = 0,8467

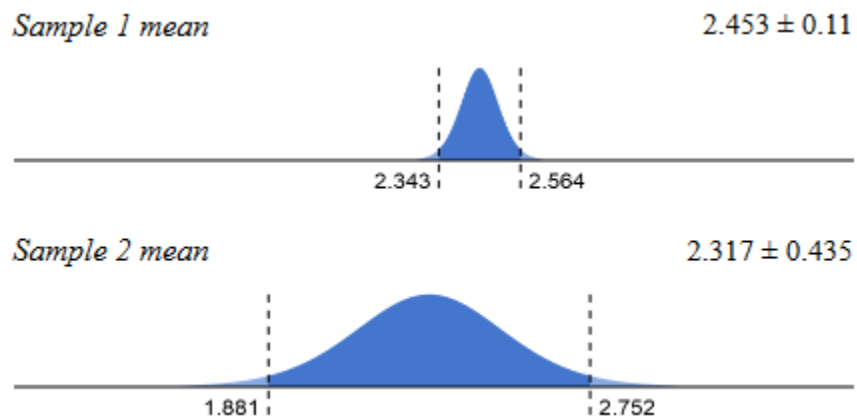
Tabela 6: Naknadni LSD test za ANOVA analizu za vrednost NADP

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
NADPpreKontrola - NADPpreNiacin		2,9538
NADPpreKontrola - NADP0Kontrola		20,2678
NADPpreKontrola - NADP0Niacin	p<0,01	-278,826
NADPpreKontrola - NADP1Kontrola		40,5351
NADPpreKontrola - NADP1Niacin	p<0,01	-352,738
NADPpreKontrola - NADP2Kontrola		28,3745
NADPpreKontrola - NADP2Niacin	p<0,01	-370,552
NADPpreNiacin - NADP0Kontrola		17,314
NADPpreNiacin - NADP0Niacin	p<0,01	-281,78
NADPpreNiacin - NADP1Kontrola		37,5813
NADPpreNiacin - NADP1Niacin	p<0,01	-355,691
NADPpreNiacin - NADP2Kontrola		25,4207
NADPpreNiacin - NADP2Niacin	p<0,01	-373,506
NADP0Kontrola - NADP0Niacin	p<0,01	-299,094
NADP0Kontrola - NADP1Kontrola		20,2673
NADP0Kontrola - NADP1Niacin	p<0,01	-373,005
NADP0Kontrola - NADP2Kontrola		8,10667
NADP0Kontrola - NADP2Niacin	p<0,01	-390,82
NADP0Niacin - NADP1Kontrola	p<0,01	319,361
NADP0Niacin - NADP1Niacin	p<0,01	-73,9113
NADP0Niacin - NADP2Kontrola	p<0,01	307,201
NADP0Niacin - NADP2Niacin	p<0,01	-91,726
NADP1Kontrola - NADP1Niacin	p<0,01	-393,273
NADP1Kontrola - NADP2Kontrola		-12,1607
NADP1Kontrola - NADP2Niacin	p<0,01	-411,087
NADP1Niacin - NADP2Kontrola	p<0,01	381,112
NADP1Niacin - NADP2Niacin		-17,8147
NADP2Kontrola - NADP2Niacin	p<0,01	-398,927

Sledeći značajan parametar je odnos NAD/NADP, koji nije pokazao statističku značajnu razliku između grupe koja je primala niacin i koja nije primala niacin. Grafička analiza distribucije frekvencije pokazuje da se odnos NAD/NADP značajno stabilizuje prilikom aplikacije niacina, odnosno distribucija frekvencije pokazuje manji stepen variranja i spljštenosti (Grafikon 5). Gotovo sve krave ogledne grupe imale su NAD/NADP odnos >2, dok je ovaj odnos imalo 70% krava kontrolne grupe. Visok odnos NAD/NADP >2,5 (koji ukazuje na optimalan status niacina) postojao je samo u uzorcima koji potiču od krava koje su primale niacin. Kod dve krave kontrolne grupe raspon je bio izuzetno visok, preko 4, ali je vrednost NADP bila veoma niska, pa se ne može sa sigurnošću zaključiti da je ovaj odnos posledica dobrog statusa

niacina. Kod ogleadne grupe pre davanja niacina 53% krava imala vrednost NAD/NADP ispod 2, a ni jedna krava nije imala vrednost odnosa iznad 2,5.

Grafikon 5: Distribucija frekvencije odnosa NAD/NADP kod krava koje su primale niacin (Sample 1 mean) i krava kontrolne grupe (Sample 2 mean) u nedelji teljenja (0 nedelja)

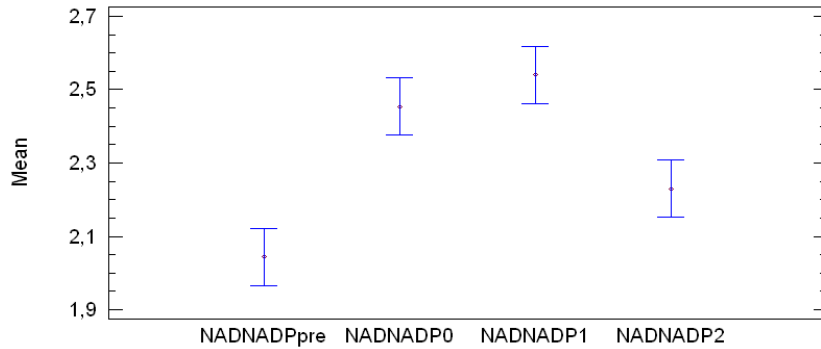


NAD/NADP odnos iznosio je: 2,04 pre aplikacije niacin, 2,45; 2,54 i 2,23 u nedelji teljenja i prvoj i drugoj nedelji po partusu redom (Tabela 7). Srednje vrednosti i standardne devijacije prikazane sun a Grafikonu 6. Odnos NAD/NADP značajno je viši kod krava posle aplikacije niacina u odnosu na period pre aplikacije ($F=16,61$, $p<0,001$), a LSD test je potvrdio ove značajne razlike (Tabela 8 i 9, Grafikon 7).

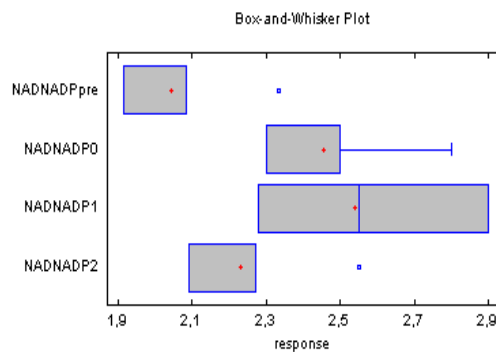
Tabela 7: NAD/NADP odnos kod krava koje su primale niacin u nedelji pre aplikacije i u ranoj laktaciji

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
NADNADPpre	15	2,04	0,17	8,13277%	1,92	2,33	0,42
NADNADP0	15	2,45	0,19	8,13274%	2,3	2,8	0,5
NADNADP1	15	2,54	0,28	11,14%	2,28	2,9	0,62
NADNADP2	15	2,23	0,18	8,21987%	2,09	2,55	0,46
Total	60	2,31	0,29	12,3011%	1,91	2,9	0,98

Grafikon 6: NAD/NADP odnos u grupi krava koja je primala niacin prikazan kao srednja vrednost \pm SD



Grafikon 7 i Tabela 8: ANOVA analiza ispitivanje razlike vrednost NAD/NADP odnosa u različitim nedeljama ogleđa



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	2,267	3	0,752334	16,61
Within	2,53627	56	0,0452905	
Total	4,79327	59		

P-Value = 0,0000

Variance Check

Levene's: 1,38374

P-Value = 0,2672

Tabela 9: LSD test značajnost razlike vrednosti NAD/NADP odnosa između različitih nedelja ogleđa

Contrast	Sig.	Difference
NADNADPre - NADNADP0	p<0,01	-0,408885
NADNADPre - NADNADP1	p<0,01	-0,496218
NADNADPre - NADNADP2	p<0,01	-0,185552
NADNADP0 - NADNADP1	NS	-0,0873333
NADNADP0 - NADNADP2	p<0,01	0,223333
NADNADP1 - NADNADP2	p<0,01	0,310667

Međusobna korelacija NAD i NADP–NAD i NADP pokazuju pozitivnu korelaciju koja je statistički značajna ($r=0,89$) kada se u uzmu obzir svi ispitivani uzorci iz ogledne i kontrolne grupe. Regresiona formula za određivanje NADP pomoću NAD glasi: $NADP=108,47+0,3453\times NAD$. Regresiona formula za određivanje NAD pomoću NADP glasi: $NAD=36,23+2,28962\times NADP$. Analiza varijanse pokazuje veoma visoku statističku značajnost navedenih modela ($F=354,92$, $p<0,0001$). Rezultati su prikazani na Grafikonu 8 i u Tabeli 10.

Grafikon 8: Korelacija i regresiona linilja između NAD i NADP

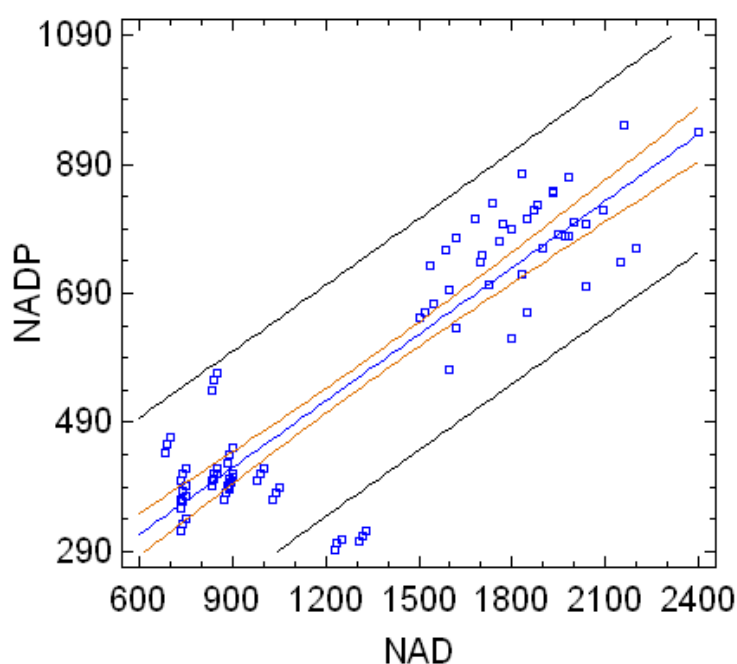


Tabela 10: Ocena regresionih modela i korelacija NAD i NADP

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Correlation Coefficient	R-squared
Model	2,86511E6	1	2,86511E6	354,92	<0,0001	0,889	79,06
Residual	758823,	94	8072,59				
Total (Corr.)	3,62394E6	95					

Površina ispod krive AUCNAD i AUCNADP (AUC, eng., area under curve) - Vrednost koja objedinjuje uticaj vremena i uticaj koncentracije NAD i NADP naziva se površina ispod

krive koju formiraju ova dva parametra, ako se kao nezavisna promenljiva uzme nedelja ogleđa, a zavisna promenljiva koncentracija NAD i NADP. AUCNAD je bila 4990,6 u grupi koja je primala niacin, odnosno 2690,9 u grupi koja nije primala niacin. AUCNADP je iznosila 2104,1 u grupi koja je primala niacin, odnosno 1201,8 u kontrolnoj grupi. Postojala je statistički značajna razlika u vrednosti AUC u ogleđnoj i kontrolnoj grupi. Odnos površina ispod krive je takav da pokazuje tendenciju porasta u grupi krava koja je primala niacin, ali bez statističke značajnosti. Vrednost odnosa površina izosila je 2,37 odnosno 2,33, i može se reći da je reprezent ukupnog odnosa NAD/NADP tokom nedelja ispitivanja. Postojanje razlike u odgovoru NAD I NADP tokom vremena ukazuje na mogućnost upotrebe ovih vitamina u proceni uticaja niacin na metaboličke promene posle teljenja kod krava. Rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11: AUCNAD i AUCNADP kod krava koje su primale i koje nisu primale niacin

	Niacin	Kontrola	p	Grafički prikaz AUC
AUCNAD	4990,6±220	2690,9±250	<0,001	
AUCNADP	2104,1±190	1201,8±180	<0,001	
AUCNAD/ AUCNADP	2,37	2,23	<0,1	

5.2 Uticaj aplikacije niacina na lipidni profil krava, glukoze, insulina i indekse insulinske rezistencije

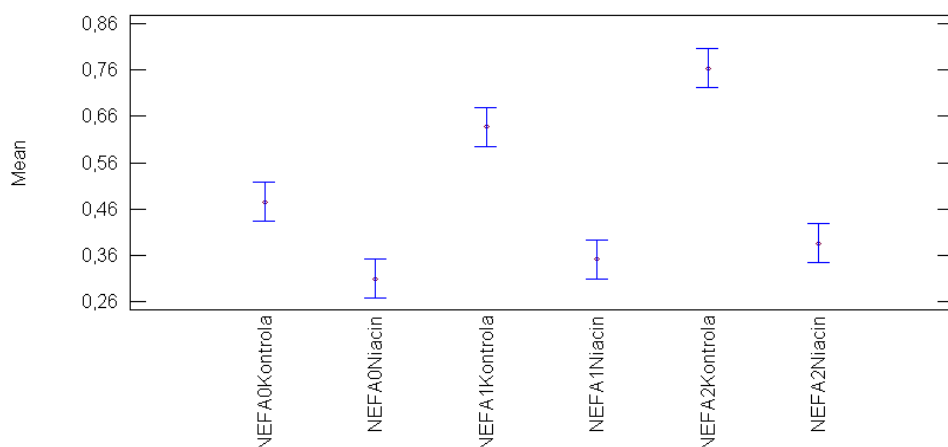
Koncentracija NEFA je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: 0,47±0,09; 0,30±0,09 (teljenje, nulta nedelja); 0,64±0,15; 0,35±0,1 (prva nedelja) i 0,76±0,13; 0,39±0,11 mmol/L (druga nedelja) (Tabela 12, Grafikon 9). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju NEFA u krvi (F=35,84; p<0,0001) (Grafikon 10, Tabela 13).

LSD test pokazuje da u grupi krava koje su primale niacin nije bilo značajnog odstupanja vrednosti NEFA u različitim nedeljama uzorkovanja, što uz značajno niže vrednosti NEFA ukazuje na antilopolitičko delovanje niacina (Tabela 14).

Tabela 12: Deskriptivna statistika za vrednosti NEFA (mmol/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
NEFA0Kontrola	15	0,475333	0,0893522	18,7978%	0,35	0,62	0,27
NEFA0Niacin	15	0,308667	0,0947076	30,6828%	0,19	0,5	0,31
NEFA1Kontrola	15	0,637333	0,147332	23,1169%	0,43	0,95	0,52
NEFA1Niacin	15	0,350667	0,101028	28,8103%	0,2	0,48	0,28
NEFA2Kontrola	15	0,763333	0,138856	18,1907%	0,57	1,05	0,48
NEFA2Niacin	15	0,385333	0,110121	28,5782%	0,22	0,53	0,31
Total	90	0,486778	0,198906	40,8618%	0,19	1,05	0,86

Grafikon 9: Prosečna vrednost \pm SD za NEFA u ogednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 10 i Tabela 13: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost NEFA

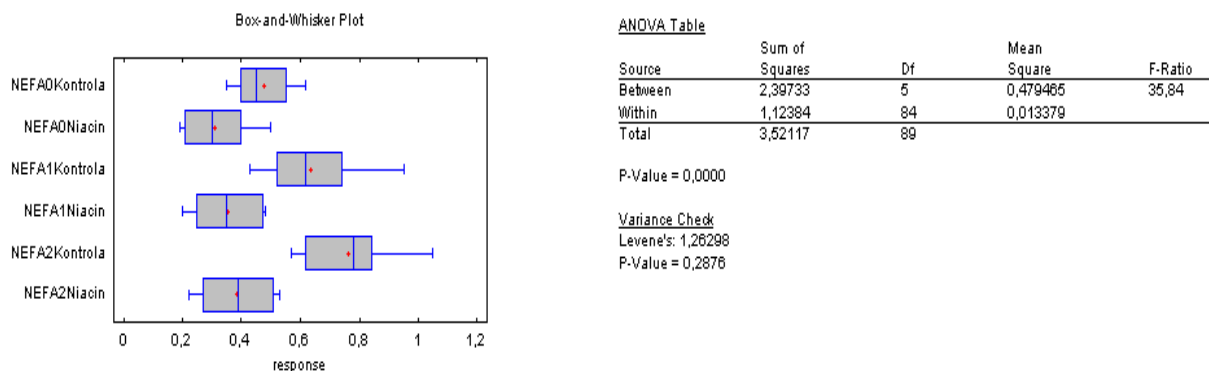


Tabela 14: LSD test razlika u vrednosti NEFA između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

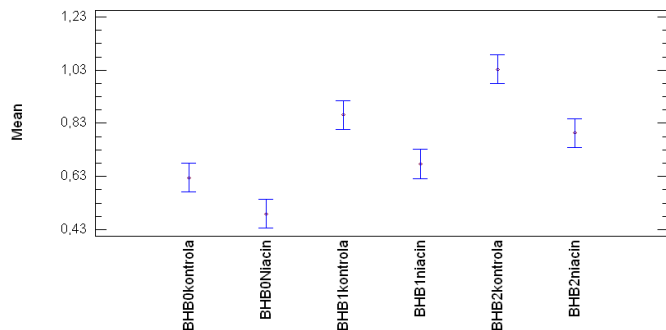
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
NEFA0Kontrola - NEFA0Niacin	p<0,01	0,166667
NEFA0Kontrola - NEFA1Kontrola	p<0,01	-0,162
NEFA0Kontrola - NEFA1Niacin	p<0,01	0,124667
NEFA0Kontrola - NEFA2Kontrola	p<0,01	-0,288
NEFA0Kontrola - NEFA2Niacin	p<0,01	0,09
NEFA0Niacin - NEFA1Kontrola	p<0,01	-0,328667
NEFA0Niacin - NEFA1Niacin	NS	-0,042
NEFA0Niacin - NEFA2Kontrola	p<0,01	-0,454667
NEFA0Niacin - NEFA2Niacin	NNS	-0,0766667
NEFA1Kontrola - NEFA1Niacin	p<0,01	0,286667
NEFA1Kontrola - NEFA2Kontrola	p<0,01	-0,126
NEFA1Kontrola - NEFA2Niacin	p<0,01	0,252
NEFA1Niacin - NEFA2Kontrola	p<0,01	-0,412667
NEFA1Niacin - NEFA2Niacin	NS	-0,0346667
NEFA2Kontrola - NEFA2Niacin	p<0,01	0,378

Koncentracija BHB je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $0,63 \pm 0,11$; $0,49 \pm 0,14$ (teljenje, nulta nedelja); $0,86 \pm 0,11$; $0,68 \pm 0,18$ (prva nedelja) i $1,03 \pm 0,14$; $0,79 \pm 0,19$ mmol/L (druga nedelja) (Tabela 15, Grafikon 11). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju BHB u krvi ($F=24,49$; $p<0,0001$) (Grafikon 12, Tabela 16). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost BHB, a da je u obe grupe zabeležen značajan porast BHB od momenta teljenja do druge nedelje ogleđa (Tabela 17).

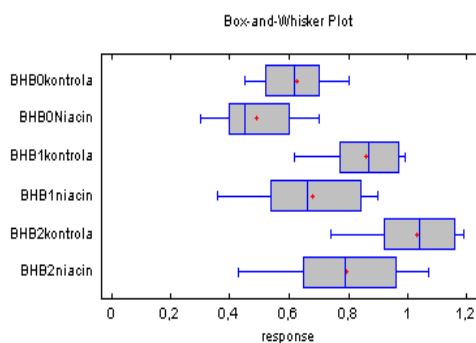
Tabela 15: Deskriptivna statistika za vrednosti BHB (mmol/L)

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
BHB0kontrola	15	0,625333	0,11575	18,5102%	0,45	0,8	0,35
BHB0Niacin	15	0,49	0,142929	29,1691%	0,3	0,7	0,4
BHB1kontrola	15	0,861333	0,11205	13,0089%	0,62	0,99	0,37
BHB1niacin	15	0,677333	0,178224	26,3126%	0,36	0,9	0,54
BHB2kontrola	15	1,03267	0,135197	13,092%	0,74	1,19	0,45
BHB2niacin	15	0,794	0,194341	24,4762%	0,43	1,07	0,64
Total	90	0,746778	0,227778	30,5014%	0,3	1,19	0,89

Grafikon 11: Prosečna vrednost \pm SD za BHB u ogednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 12 i Tabela 16: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost BHB



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	2,73887	5	0,547774	24,49
Within	1,87869	84	0,0223654	
Total	4,61757	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check

Levene's: 2,86883

P-Value = 0,0193

Tabela 17: LSD test razlika u vrednosti BHB između različitih eksperimentnalnih grupa za ANOVA analizu

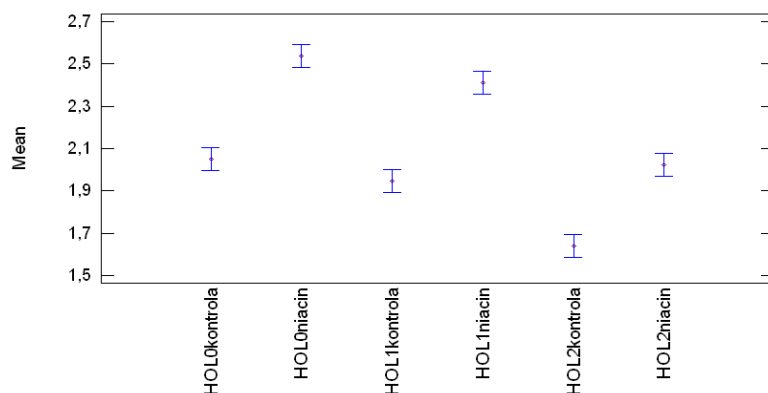
Contrast	Sig.	Difference
BHB0kontrola - BHB0Niacin	p<0,01	0,135333
BHB0kontrola - BHB1kontrola	p<0,01	-0,236
BHB0kontrola - BHB1niacin	NS	-0,052
BHB0kontrola - BHB2kontrola	p<0,01	-0,407333
BHB0kontrola - BHB2niacin	p<0,01	-0,168667
BHB0Niacin - BHB1kontrola	p<0,01	-0,371333
BHB0Niacin - BHB1niacin	p<0,01	-0,187333
BHB0Niacin - BHB2kontrola	p<0,01	-0,542667
BHB0Niacin - BHB2niacin	p<0,01	-0,304
BHB1kontrola - BHB1niacin	p<0,01	0,184
BHB1kontrola - BHB2kontrola	p<0,01	-0,171333
BHB1kontrola - BHB2niacin	NS	0,0673333
BHB1niacin - BHB2kontrola	p<0,01	-0,355333
BHB1niacin - BHB2niacin	p<0,01	-0,116667
BHB2kontrola - BHB2niacin	p<0,01	0,238667

Koncentracija holesterola je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $2,05 \pm 0,13$; $2,54 \pm 0,19$ (teljenje, nulta nedelja); $1,95 \pm 0,13$; $2,41 \pm 0,18$ (prva nedelja) i $1,64 \pm 0,11$; $2,02 \pm 0,15$ mmol/L (druga nedelja) (Tabela 18, Grafikon 13). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju holesterola u krvi krava ($F=71,64$; $p<0,0001$) (Grafikon 14, Tabela 19). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju višu vrednost holesterola u svim nedeljama ogleđa, a da je u obe grupe zabeležen značajan pad vrednosti holesterola od momenta teljenja do druge nedelje ogleđa (Tabela 20).

Tabela 18: Deskriptivna statistika za vrednosti holesterola (mmol/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
HOL0kontrola	15	2,04867	0,134582	6,56926%	1,8	2,3	0,5
HOL0niacin	15	2,53667	0,187032	7,37314%	2,1	2,72	0,62
HOL1kontrola	15	1,94667	0,128434	6,59763%	1,71	2,19	0,48
HOL1niacin	15	2,41133	0,176832	7,33337%	2,0	2,58	0,58
HOL2kontrola	15	1,638	0,107584	6,568%	1,44	1,84	0,4
HOL2niacin	15	2,024	0,14657	7,24162%	1,68	2,17	0,49
Total	90	2,10089	0,333004	15,8506%	1,44	2,72	1,28

Grafikon 13: Prosečna vrednost \pm SD za holesterol u ogednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 14 i Tabela 19:ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost holesterola

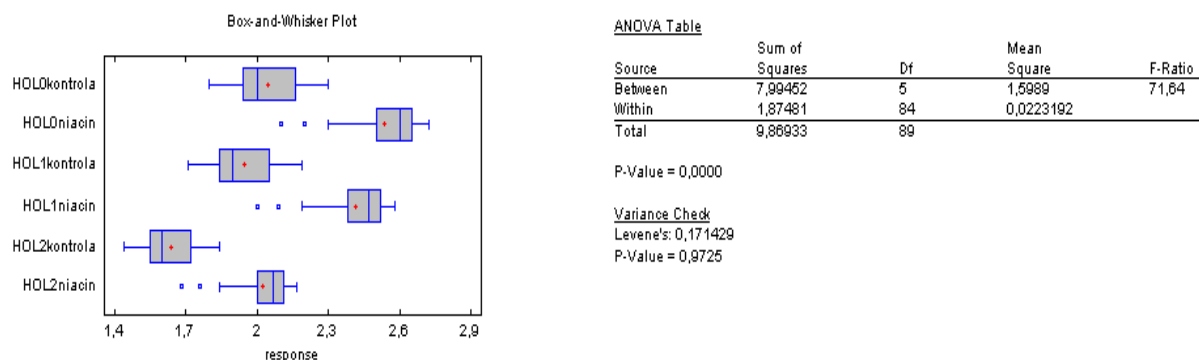


Tabela 20: LSD test razlika u vrednosti holesterola između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

Contrast	Sig.	Difference
HOL0kontrola - HOL0niacin	p<0,01	-0,488
HOL0kontrola - HOL1kontrola	NS	0,102
HOL0kontrola - HOL1niacin	p<0,01	-0,362667
HOL0kontrola - HOL2kontrola	p<0,01	0,410667
HOL0kontrola - HOL2niacin	NS	0,0246667
HOL0niacin - HOL1kontrola	p<0,01	0,59
HOL0niacin - HOL1niacin	p<0,05	0,125333
HOL0niacin - HOL2kontrola	p<0,01	0,898667
HOL0niacin - HOL2niacin	p<0,01	0,512667
HOL1kontrola - HOL1niacin	p<0,01	-0,464667
HOL1kontrola - HOL2kontrola	p<0,01	0,308667
HOL1kontrola - HOL2niacin	NS	-0,0773333
HOL1niacin - HOL2kontrola	p<0,01	0,773333
HOL1niacin - HOL2niacin	p<0,01	0,387333
HOL2kontrola - HOL2niacin	p<0,01	-0,386

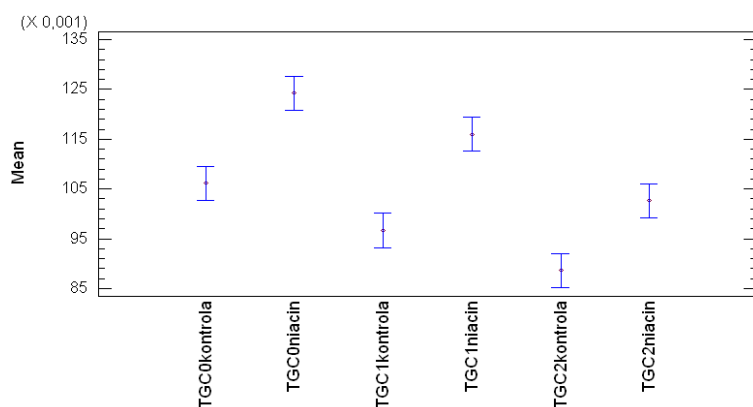
Koncentracija triglicerida je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $0,11 \pm 0,01$; $0,12 \pm 0,009$ (teljenje, nulta nedelja); $0,097 \pm 0,01$; $0,116 \pm 0,01$ (prva nedelja) i $0,09 \pm 0,007$; $0,1 \pm 0,009$ mmol/L (druga nedelja) (Tabela 21, Grafikon 15). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju triglicerida u krvi krava ($F=28,03$; $p<0,0001$) (Grafikon 16, Tabela 22). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju višu vrednost

triglicerida u svim nedeljama ogleda, a da je u obe grupe zabeležen značajan pad vrednosti triglicerida od momenta teljenja do druge nedelje ogleda (Tabela 23).

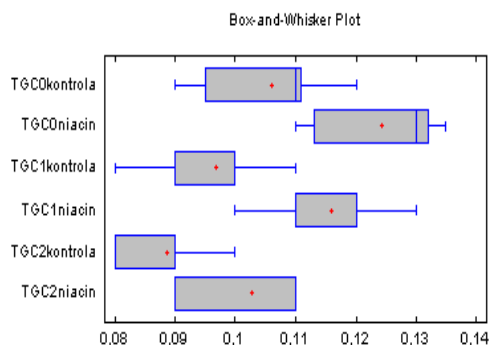
Tabela 21: Deskriptivna statistika za vrednosti triglicerida (mmol/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
TGC0kontrola	15	0,106133	0,0104804	9,87472%	0,09	0,12	0,03
TGC0niacin	15	0,124267	0,00918436	7,39084%	0,11	0,135	0,025
TGC1kontrola	15	0,0966667	0,0104654	10,8262%	0,08	0,11	0,03
TGC1niacin	15	0,116	0,00985611	8,49664%	0,1	0,13	0,03
TGC2kontrola	15	0,0886667	0,00743223	8,38222%	0,08	0,1	0,02
TGC2niacin	15	0,102667	0,00883715	8,60761%	0,09	0,11	0,02
Total	90	0,105733	0,0149747	14,1627%	0,08	0,135	0,055

Grafikon 15: Prosečna vrednost \pm SD za trigliceride u ogednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 16 i Tabela 22: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost triglicerida



ANOVA Table				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	0,0124789	5	0,00249579	28,03
Within	0,00747867	84	0,0000890317	
Total	0,0199576	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 0,241973
P-Value = 0,9427

Tabela 23:LSD test razlika u vrednosti triglicerida između različitih eksperimetnalnih grupa za ANOVA analizu

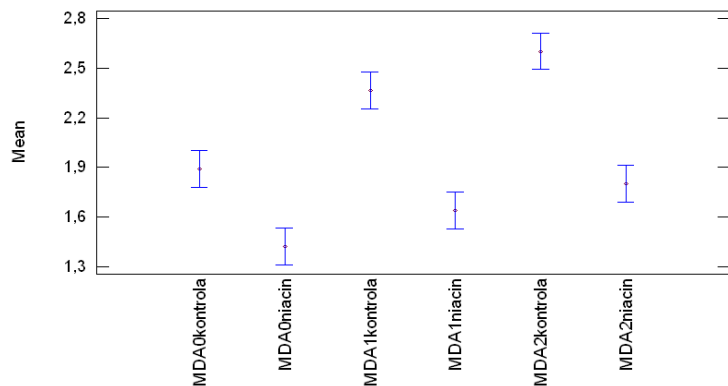
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
TGC0kontrola - TGC0niacin	p<0,01	-0,0181333
TGC0kontrola - TGC1kontrola	p<0,05	0,00946667
TGC0kontrola - TGC1niacin	p<0,05	-0,00986667
TGC0kontrola - TGC2kontrola	p<0,01	0,0174667
TGC0kontrola - TGC2niacin	NS	0,00346667
TGC0niacin - TGC1kontrola	p<0,01	0,0276
TGC0niacin - TGC1niacin	p<0,05	0,00826667
TGC0niacin - TGC2kontrola	p<0,01	0,0356
TGC0niacin - TGC2niacin	p<0,01	0,0216
TGC1kontrola - TGC1niacin	p<0,05	-0,0193333
TGC1kontrola - TGC2kontrola	p<0,01	0,008
TGC1kontrola - TGC2niacin	NS	-0,006
TGC1niacin - TGC2kontrola	p<0,01	0,0273333
TGC1niacin - TGC2niacin	p<0,01	0,0133333
TGC2kontrola - TGC2niacin	p<0,01	-0,014

Koncentracija MDA je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $1,89 \pm 0,33$; $1,42 \pm 0,13$ (teljenje, nulta nedelja); $2,37 \pm 0,41$; $1,64 \pm 0,15$ (prva nedelja) i $2,6 \pm 0,45$; $1,8 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$ (druga nedelja) (Tabela 24, Grafikon 17). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju MDA u krvi krava ($F=32,46$; $p<0,0001$) (Grafikon 18, Tabela 25). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost MDA u svim nedeljama ogleđa, a da je u obe grupe zabeležen značajan porast vrednosti MDA od momenta teljenja do druge nedelje ogleđa (Tabela 26). Međutim, u grupi krava koja je primala niacin nije utvrđen značajan porast vrednosti MDA u drugoj nedelji posle teljenja u odnosu na prvu.

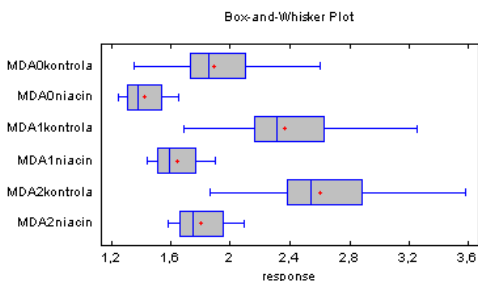
Tabela 24: Deskriptivna statistika za vrednosti MDA ($\mu\text{mol/L}$)

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
MDA0kontrola	15	1,89133	0,328718	17,3802%	1,35	2,6	1,25
MDA0niacin	15	1,424	0,134897	9,47309%	1,25	1,65	0,4
MDA1kontrola	15	2,36533	0,410955	17,3741%	1,69	3,25	1,56
MDA1niacin	15	1,63933	0,15397	9,39221%	1,44	1,9	0,46
MDA2kontrola	15	2,602	0,452125	17,3761%	1,86	3,58	1,72
MDA2niacin	15	1,80133	0,170958	9,49064%	1,58	2,09	0,51
Total	90	1,95389	0,504792	25,8353%	1,25	3,58	2,33

Grafikon 17: Prosečna vrednost \pm SD za MDA u ogednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 18 i Tabela 25: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost MDA



Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	14,9437	5	2,98875	32,46
Within	7,73481	84	0,0920811	
Total	22,6785	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 2,40746
P-Value = 0,0432

Tabela 26: LSD test razlika u vrednosti MDA između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

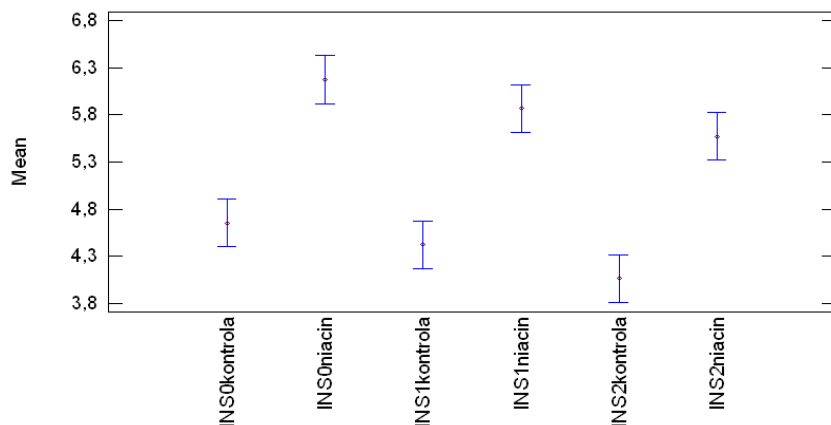
Contrast	Sig.	Difference
MDA0kontrola - MDA0niacin	p<0,01	0,467333
MDA0kontrola - MDA1kontrola	p<0,01	-0,474
MDA0kontrola - MDA1niacin	p<0,01	0,252
MDA0kontrola - MDA2kontrola	p<0,01	-0,710667
MDA0kontrola - MDA2niacin	NS	0,09
MDA0niacin - MDA1kontrola	p<0,01	-0,941333
MDA0niacin - MDA1niacin	NS	-0,215333
MDA0niacin - MDA2kontrola	p<0,01	-1,178
MDA0niacin - MDA2niacin	p<0,05	-0,377333
MDA1kontrola - MDA1niacin	p<0,01	0,726
MDA1kontrola - MDA2kontrola	p<0,05	-0,236667
MDA1kontrola - MDA2niacin	p<0,01	0,564
MDA1niacin - MDA2kontrola	p<0,01	-0,962667
MDA1niacin - MDA2niacin	NS	-0,162
MDA2kontrola - MDA2niacin	p<0,01	0,800667

Koncentracija insulina je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $4,65 \pm 0,63$; $6,17 \pm 0,83$ (teljenje, nulta nedelja); $4,42 \pm 0,6$; $5,87 \pm 0,78$ (prva nedelja) i $4,07 \pm 0,55$; $5,57 \pm 0,75 \mu\text{U/mL}$ (druga nedelja) (Tabela 27, Grafikon 19). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju insulina u krvi krava ($F=22,77$; $p<0,0001$) (Grafikon 20, Tabela 28). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju višu vrednost insulina u svim nedeljama ogleđa. Nije zabeležen statistički značajan pad insulina u prvoj u odnosu na nultu nedelju, kao i u drugoj u odnosu na prvu, ali je postojala značajno niža koncentracija insulina u drugoj nedelji po teljenju u odnosu na nedelju teljenja, što važi za oglednu i kontrolnu grupu (Tabela 29).

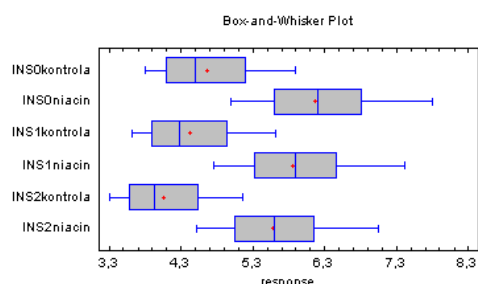
Tabela 27: Deskriptivna statistika za vrednosti insulina ($\mu\text{U/mL}$)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
INS0kontrola	15	4,65333	0,628907	13,5152%	3,8	5,9	2,1
INS0niacin	15	6,17333	0,825891	13,3784%	5,0	7,8	2,8
INS1kontrola	15	4,424	0,597958	13,5162%	3,61	5,61	2,0
INS1niacin	15	5,86733	0,784779	13,3754%	4,75	7,41	2,66
INS2kontrola	15	4,06667	0,549905	13,5222%	3,32	5,16	1,84
INS2niacin	15	5,572	0,747407	13,4136%	4,51	7,04	2,53
Total	90	5,12611	1,03872	20,2634%	3,32	7,8	4,48

Grafikon 19: Prosečna vrednost \pm SD za insulin u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 20 i Tabela 28:ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost insulina



ANOVA Table				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	55,267	5	11,0514	22,77
Within	40,7889	84	0,485344	
Total	96,0259	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 0,48332
P-Value = 0,7878

Tabela 29:LSD test razlika u vrednosti insulina između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

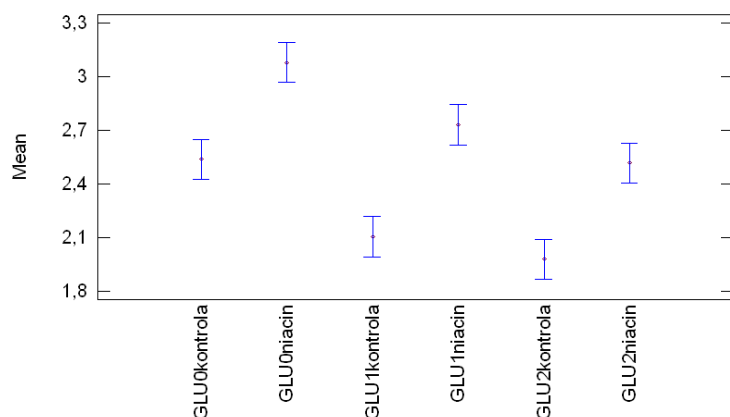
Contrast	Sig.	Difference
INS0kontrola - INS0niacin	p<0,01	-1,52
INS0kontrola - INS1kontrola	NS	0,229333
INS0kontrola - INS1niacin	p<0,01	-1,214
INS0kontrola - INS2kontrola	p<0,05	0,586667
INS0kontrola - INS2niacin	p<0,01	-0,918667
INS0niacin - INS1kontrola	p<0,01	1,74933
INS0niacin - INS1niacin	NS	0,306
INS0niacin - INS2kontrola	p<0,01	2,10667
INS0niacin - INS2niacin	p<0,05	0,601333
INS1kontrola - INS1niacin	p<0,01	-1,44333
INS1kontrola - INS2kontrola	NS	0,357333
INS1kontrola - INS2niacin	p<0,01	-1,148
INS1niacin - INS2kontrola	p<0,01	1,80067
INS1niacin - INS2niacin	NS	0,295333
INS2kontrola - INS2niacin	p<0,01	-1,50533

Koncentracija glukoze je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $2,54 \pm 0,3$; $3,08 \pm 0,37$ (teljenje, nulta nedelja); $2,1 \pm 0,25$; $2,73 \pm 0,32$ (prva nedelja) i $1,98 \pm 0,23$; $2,52 \pm 0,36$ mmol/L (druga nedelja) (Tabela 30, Grafikon 21). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju glukoze u krvi krava ($F=25,66$; $p<0,0001$) (Grafikon 22, Tabela 31). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju višu vrednost glukoze u svim nedeljama ogleđa. Pokazan je i značajan pad glikemije posle teljenja u obe grupe, a vrednosti glikemije se nisu značajno razlikovale u drugoj u odnosu na prvu nedelju posle teljenja u obe grupe krava (Tabela 32).

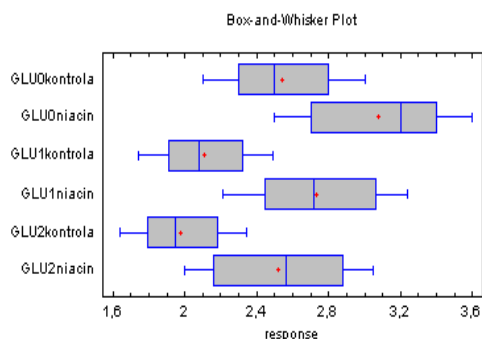
Tabela 30: Deskriptivna statistika za vrednosti glukoze (mmol/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
GLU0kontrola	15	2,53733	0,301626	11,8875%	2,1	3,0	0,9
GLU0niacin	15	3,08	0,368782	11,9734%	2,5	3,6	1,1
GLU1kontrola	15	2,106	0,25048	11,8936%	1,74	2,49	0,75
GLU1niacin	15	2,732	0,320963	11,7483%	2,21	3,24	1,03
GLU2kontrola	15	1,97867	0,234212	11,8369%	1,64	2,34	0,7
GLU2niacin	15	2,51733	0,355698	14,1299%	2,0	3,05	1,05
Total	90	2,49189	0,477773	19,1731%	1,64	3,6	1,96

Grafikon 21: Prosečna vrednost \pm SD za glukozu u ogleđnoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 22 i Tabela 31: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost glukoze



Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	12,2782	5	2,45564	26,66
Within	8,03756	84	0,0956852	
Total	20,3158	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 1,10786
P-Value = 0,3825

Tabela 32:LSD test razlika u vrednosti glukoze između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

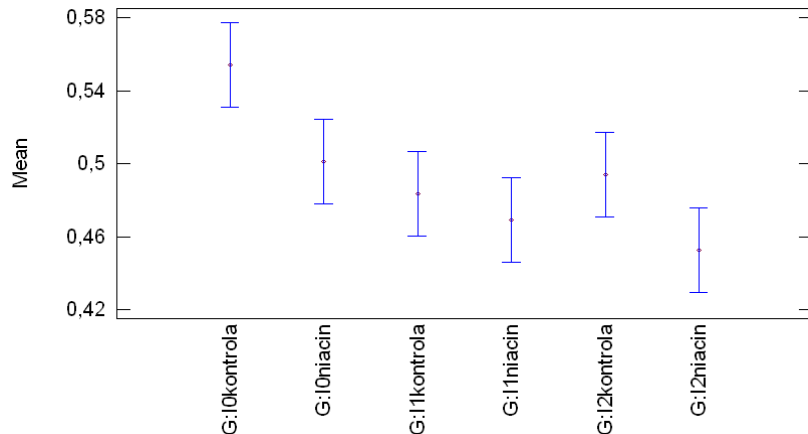
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
GLU0kontrola - GLU0niacin	p<0,01	-0,542667
GLU0kontrola - GLU1kontrola	p<0,01	0,431333
GLU0kontrola - GLU1niacin	NS	-0,194667
GLU0kontrola - GLU2kontrola	p<0,01	0,558667
GLU0kontrola - GLU2niacin	NS	0,02
GLU0niacin - GLU1kontrola	p<0,01	0,974
GLU0niacin - GLU1niacin	p<0,01	0,348
GLU0niacin - GLU2kontrola	p<0,01	1,10133
GLU0niacin - GLU2niacin	p<0,01	0,562667
GLU1kontrola - GLU1niacin	p<0,01	-0,626
GLU1kontrola - GLU2kontrola	NS	0,127333
GLU1kontrola - GLU2niacin	p<0,01	-0,411333
GLU1niacin - GLU2kontrola	p<0,01	0,753333
GLU1niacin - GLU2niacin	NS	0,214667
GLU2kontrola - GLU2niacin	p<0,01	-0,538667

Vrednost indeksa glukoza:insulin(G:I) pokazuje tendenciju da bude niže u grupi krava koja je primala niacin u odnosu na kontrolnu grupu, a statistički značajna razlika utvrđena je samo u nedelji teljenja. Vrednost G:I indeksa opada tokom posmatranja u ogleđnoj i kontrolnoj grupi. Sve statističke razlike utvrđene ANOVA testom imale su slabu statističku snagu čak i kod utvrđene statističke razlike. Rezultati su prikazani u Tabeli 33, 34 i 35 i na Grafikonu 23 i 24. Ovakav nalaz, u kome krave koje primaju niacin imaju slabiju potrošnju glukoze po jedinici insulina, bi se mogao pripisati biološkim efektima niacina. Kod ispitivanih krava postoji pozitivna korelacija glukoze i insulina (Grafikon 25), što se može povezati sa činjenicom da aplikacija niacina dovodi do porasta glikemije i insulinemije u odnosu na kontrolnu grupu. Sa druge strane, sa porastom koncentracije insulina u krvi opada vrednosti G:I odnosno metaboliše se manje glukoze po jedinici insulina (Grafikon 26).

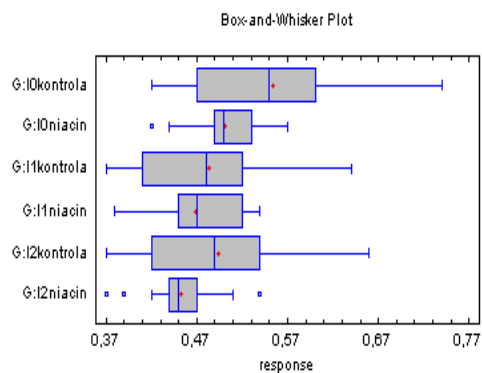
Tabela 33: Deskriptivna statistika za vrednosti G:I indeksa

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
G:I0kontrola	15	0,554	0,0867509	15,659%	0,42	0,74	0,32
G:I0niacin	15	0,501333	0,0415532	8,28853%	0,42	0,57	0,15
G:I1kontrola	15	0,483333	0,0730623	15,1163%	0,37	0,64	0,27
G:I1niacin	15	0,469333	0,0444758	9,47637%	0,38	0,54	0,16
G:I2kontrola	15	0,494	0,0779927	15,788%	0,37	0,66	0,29
G:I2niacin	15	0,452667	0,0423365	9,35269%	0,37	0,54	0,17
Total	90	0,492444	0,0697719	14,1685%	0,37	0,74	0,37

Grafikon 23: Prosečna vrednost \pm SD za G:I indeks u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 24 i Tabela 34: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost G:I indeksa



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	0,0910489	5	0,0182098	4,47
Within	0,342213	84	0,00407397	
Total	0,433262	89		

P-Value = 0,0012

Variance Check

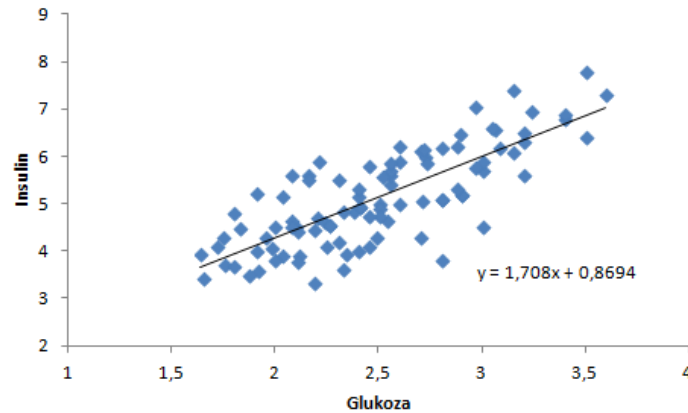
Levene's: 2,03811

P-Value = 0,0815

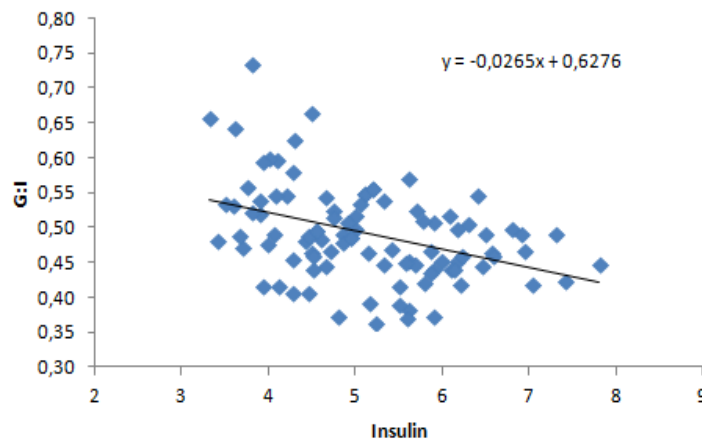
Tabela 35: LSD test razlika u vrednosti G:I indeksa između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

Contrast	Sig.	Difference
G:I0kontrola - G:I0niacin	p<0,05	0,0526667
G:I0kontrola - G:I1kontrola	p<0,05	0,0706667
G:I0kontrola - G:I1niacin	p<0,05	0,0846667
G:I0kontrola - G:I2kontrola	p<0,05	0,06
G:I0kontrola - G:I2niacin	p<0,05	0,101333
G:I0niacin - G:I1kontrola	NS	0,018
G:I0niacin - G:I1niacin	NS	0,032
G:I0niacin - G:I2kontrola	NS	0,00733333
G:I0niacin - G:I2niacin	p<0,05	0,0486667
G:I1kontrola - G:I1niacin	NS	0,014
G:I1kontrola - G:I2kontrola	NS	-0,0106667
G:I1kontrola - G:I2niacin	NS	0,0306667
G:I1niacin - G:I2kontrola	NS	-0,0246667
G:I1niacin - G:I2niacin	NS	0,0166667
G:I2kontrola - G:I2niacin	NS	0,0413333

Grafikon 25: Korelacija i regresija glukoze i insulina u svim ispitivanim uzorcima



Grafikon 26: Korelacija i regresija insulina i G:I indeksa u svim ispitivanim uzorcima

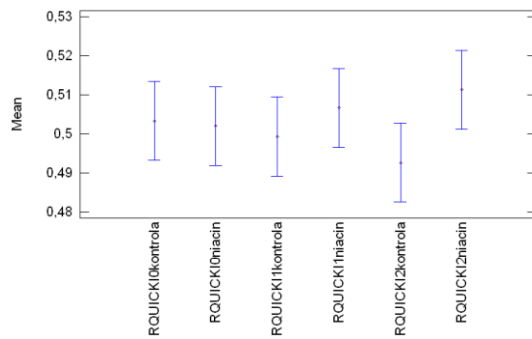


Vrednost RQUICKI indeksa insulinske rezistencije kod krava nije se razlikovala u funkciji aplikacije niacina i nedelje ogleđa. Ipak kod krava koje su primale niacin postojao je trend porasta vrednosti RQUICKI indeksa, dok je kod krava koje su bile kontrolna grupa postojao trend pada RQUICKI indeksa od teljenja prema drugoj nedelji (Tabela 36 i 37, Grafikon 27 i 28). RQUICKI indeks negativno korelira savrednostima NEFA, insulina i glukoze, ali je ova korelacija statistički značajna samo za NEFA (Grafikon 29, 30, 31). Ovo ukazuje da tendencija povećane insulinske senzitivnosti kod krava koje su primale niacin nastaje kao posledica povećane insulinske senzitivnosti masnog tkiva i smanjene lipolize.

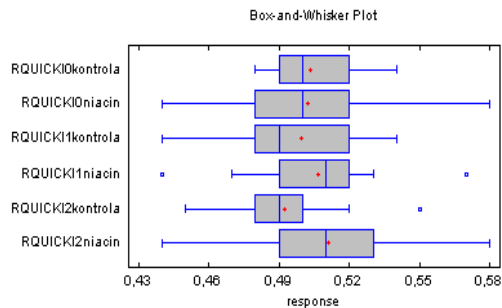
Tabela 36: Deskriptivna statistika za vrednosti RQUICKI indeksa

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
RQUICKI0kontrola	15	0,503333	0,0187718	3,7295%	0,48	0,54	0,06
RQUICKI0niacin	15	0,502	0,0327763	6,52914%	0,44	0,58	0,14
RQUICKI1kontrola	15	0,499333	0,0260403	5,21501%	0,44	0,54	0,1
RQUICKI1niacin	15	0,506667	0,0296808	5,85806%	0,44	0,57	0,13
RQUICKI2kontrola	15	0,492667	0,0237447	4,81962%	0,45	0,55	0,1
RQUICKI2niacin	15	0,511333	0,0333524	6,52263%	0,44	0,58	0,14
Total	90	0,502556	0,0277047	5,51277%	0,44	0,58	0,14

Grafikon 27: Prosečna vrednost \pm SD za RQUICKI indeks u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 28 i Tabela 37: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost RQUICKI indeksa



ANOVA Table

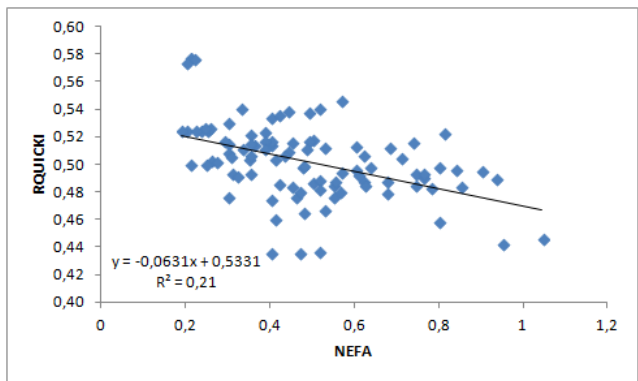
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	0,00304556	5	0,000609111	0,78
Within	0,0652667	84	0,000776984	
Total	0,0683122	89		

P-Value = 0,5641

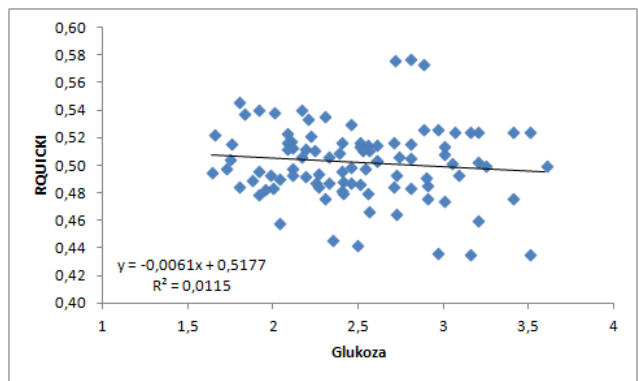
Variance Check

Levene's: 0,538838
P-Value = 0,7463

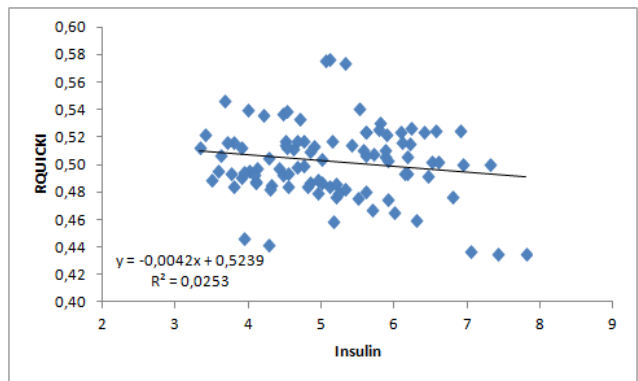
Grafikon 29:Korelacija i regresija NEFA i RQUICKI indeksa u svim ispitivanim uzorcima



Grafikon 30: Korelacija i regresija glukoze i RQUICKI indeksa u svim ispitivanim uzorcima



Grafikon 31:Korelacija i regresija insulina i RQUICKI indeksa u svim ispitivanim uzorcima

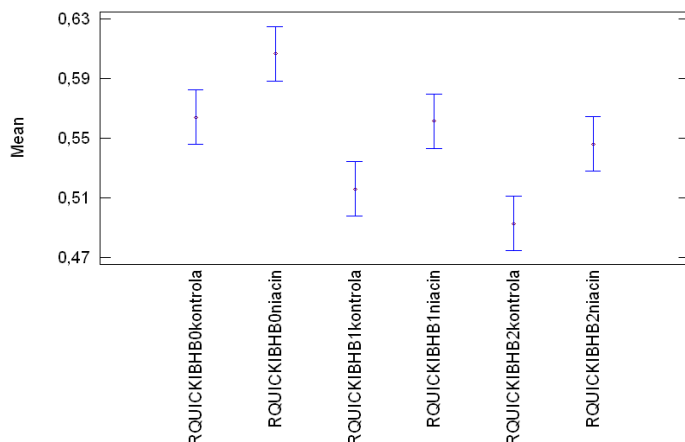


RQUICKIBHB indeks insulinske rezistencije se pokazao najboljim pokazateljem, jer se značajno menjao u funkciji aplikacije niacije i vremena. Vrednost RQUICKIBHB indeksa je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $0,56 \pm 0,04$; $0,61 \pm 0,08$ (teljenje, nulta nedelja); $0,52 \pm 0,03$; $0,56 \pm 0,06$ (prva nedelja) i $0,49 \pm 0,03$; $0,55 \pm 0,05$ (druga nedelja) (Tabela 37, Grafikon 32). Ovakav rezultat potvrđuje veću senzibilnost masnog tkiva na insulin u grupi koja je primala niacin. ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost RQUICKIBHB indeksa ($F=9,44$; $p<0,0001$) (Grafikon 33, Tabela 38). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju višu vrednost RQUICKIBHB indeksa u svim nedeljama ogleđa. Pokazan je i signifikantan uticaj nedeljena vrednost ovog indeksa koji je opadao posle teljenja (Tabela 39).

Tabela 37: Deskriptivna statistika za vrednosti RQUICKIBHB indeksa

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
RQUICKIBHB0kontrola	15	0,564	0,0427284	7,57595%	0,5	0,63	0,13
RQUICKIBHB0niacin	15	0,606667	0,0763139	12,5792%	0,49	0,75	0,26
RQUICKIBHB1kontrola	15	0,516	0,0320268	6,20674%	0,45	0,58	0,13
RQUICKIBHB1niacin	15	0,561333	0,0564253	10,052%	0,47	0,7	0,23
RQUICKIBHB2kontrola	15	0,492667	0,0296327	6,01475%	0,44	0,54	0,1
RQUICKIBHB2niacin	15	0,546	0,0495407	9,0734%	0,46	0,67	0,21
Total	90	0,547778	0,0610908	11,1525%	0,44	0,75	0,31

Grafikon 32: Prosečna vrednost \pm SD za RQUICKIBHB indeks u ogleđnoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 33 i Tabela 38: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost RQUICKIBHB indeksa

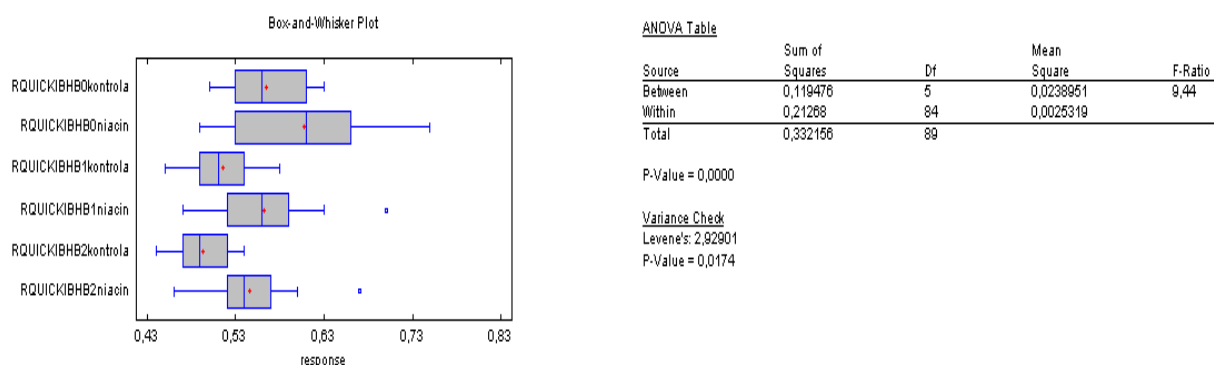


Tabela 39: LSD test razlika u vrednosti RQUICKIBHB indeksa između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

Contrast	Sig.	Difference
RQUICKIBHB0kontrola - RQUICKIBHB0niacin	p<0,01	-0,0426667
RQUICKIBHB0kontrola - RQUICKIBHB1kontrola	p<0,01	0,048
RQUICKIBHB0kontrola - RQUICKIBHB1niacin	NS	0,00266667
RQUICKIBHB0kontrola - RQUICKIBHB2kontrola	p<0,01	0,0713333
RQUICKIBHB0kontrola - RQUICKIBHB2niacin	NS	0,018
RQUICKIBHB0niacin - RQUICKIBHB1kontrola	p<0,01	0,0906667
RQUICKIBHB0niacin - RQUICKIBHB1niacin	p<0,01	0,0453333
RQUICKIBHB0niacin - RQUICKIBHB2kontrola	p<0,01	0,114
RQUICKIBHB0niacin - RQUICKIBHB2niacin	p<0,01	0,0606667
RQUICKIBHB1kontrola - RQUICKIBHB1niacin	p<0,01	-0,0453333
RQUICKIBHB1kontrola - RQUICKIBHB2kontrola	NS	0,0233333
RQUICKIBHB1kontrola - RQUICKIBHB2niacin	NS	-0,03
RQUICKIBHB1niacin - RQUICKIBHB2kontrola	p<0,01	0,0686667
RQUICKIBHB1niacin - RQUICKIBHB2niacin	NS	0,0153333
RQUICKIBHB2kontrola - RQUICKIBHB2niacin	p<0,01	-0,0533333

5.3 Uticaj aplikacije niacina na vrednost ostalih metaboličkih parametara

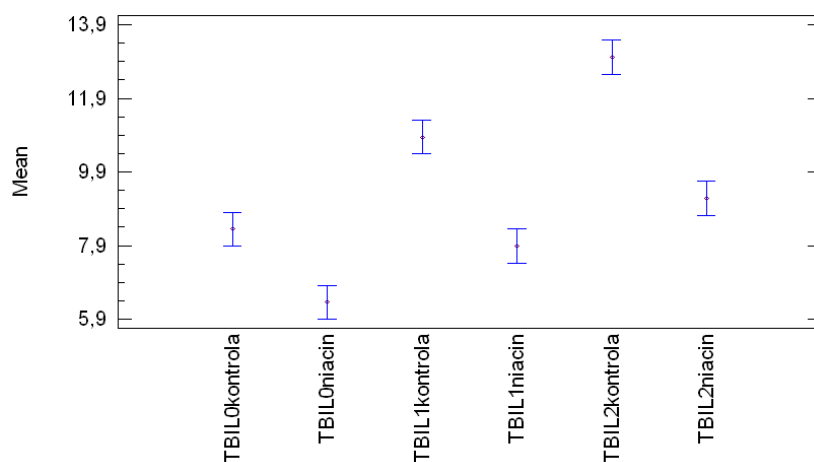
Koncentracija ukupnog bilirubina je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $8,34 \pm 0,96$; $6,36 \pm 1,21$ (teljenje, nulta nedelja); $10,85 \pm 1,25$; $7,89 \pm 1,28$ (prva nedelja) i $13,02 \pm 1,5$; $9,18 \pm 1,32 \mu\text{mol/L}$ (druga nedelja) (Tabela 40, Grafikon 34). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost ukupnog bilirubina ($F=51,97$; $p<0,0001$) (Grafikon 35, Tabela 41). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost bilirubina u

svim nedeljama ogledu odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj nedelje posle teljenja je takođe značajan, a vrednost bilirubina raste kod ogleadne i kontrolne grupe krava (Tabela 42).

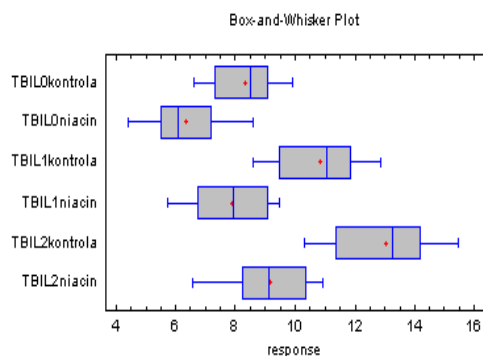
Tabela 40: Deskriptivna statistika za vrednosti ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/L}$)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
TBIL0kontrola	15	8,34667	0,964266	11,5527%	6,6	9,9	3,3
TBIL0niacin	15	6,36	1,21467	19,0986%	4,4	8,6	4,2
TBIL1kontrola	15	10,8507	1,25355	11,5527%	8,58	12,87	4,29
TBIL1niacin	15	7,89	1,27974	16,2198%	5,72	9,49	3,77
TBIL2kontrola	15	13,0207	1,5037	11,5486%	10,3	15,44	5,14
TBIL2niacin	15	9,18267	1,32421	14,4207%	6,58	10,91	4,33
Total	90	9,27511	2,48994	26,8454%	4,4	15,44	11,04

Grafikon 34: Prosečna vrednost \pm SD za ukupni bilirubin u ogleдноj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 35 i Tabela 41: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na vrednost ukupnog bilirubina



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	416,978	5	83,3956	51,97
Within	134,806	84	1,60483	
Total	551,784	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 0,656158
P-Value = 0,6576

Tabela 42:LSD test razlika u vrednosti ukupnog bilirubina između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

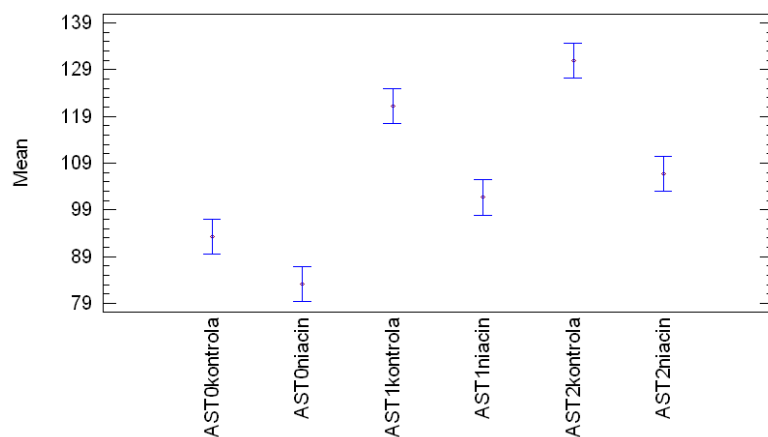
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
TBIL0kontrola - TBIL0niacin	p<0,01	1,98667
TBIL0kontrola - TBIL1kontrola	p<0,01	-2,504
TBIL0kontrola - TBIL1niacin	NS	0,456667
TBIL0kontrola - TBIL2kontrola	p<0,01	-4,674
TBIL0kontrola - TBIL2niacin	NS	-0,836
TBIL0niacin - TBIL1kontrola	p<0,01	-4,49067
TBIL0niacin - TBIL1niacin	p<0,01	-1,53
TBIL0niacin - TBIL2kontrola	p<0,01	-6,66067
TBIL0niacin - TBIL2niacin	p<0,01	-2,82267
TBIL1kontrola - TBIL1niacin	p<0,01	2,96067
TBIL1kontrola - TBIL2kontrola	p<0,01	-2,17
TBIL1kontrola - TBIL2niacin	p<0,01	1,668
TBIL1niacin - TBIL2kontrola	p<0,01	-5,13067
TBIL1niacin - TBIL2niacin	p<0,01	-1,29267
TBIL2kontrola - TBIL2niacin	p<0,01	3,838

Vrednost AST je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: 93,33±7,91:93,13±11,94 (teljenje, nulta nedelja); 121,18±9,83:101,67±10,38 (prva nedelja) i 130,88±10,62:106,75±10,9IU/L (druga nedelja) (Tabela 43, Grafikon 36). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost AST (F=43,56; p<0,0001) (Grafikon 37, Tabela 44). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost AST u svim nedeljama ogleda u odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj nedelje posle teljenja je takođe značajan, a vrednost AST raste kod ogledne i kontrolne grupe krava (Tabela 45).

Tabela 43: Deskriptivna statistika za aktivnost AST u krvi (IU/L)

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
AST0kontrola	15	93,3333	7,91623	8,48167%	82,0	110,0	28,0
AST0niacin	15	83,1333	11,9395	14,3619%	62,0	99,0	37,0
AST1kontrola	15	121,18	9,82985	8,11178%	109,2	143,0	33,8
AST1niacin	15	101,667	10,3822	10,212%	80,6	119,6	39,0
AST2kontrola	15	130,875	10,616	8,11154%	117,94	154,44	36,5
AST2niacin	15	106,751	10,9014	10,212%	84,63	125,58	40,95
Total	90	106,157	19,0365	17,9325%	62,0	154,44	92,44

Grafikon 36: Prosečna vrednost \pm SD za aktivnost AST u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 37 i Tabela 44: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na aktivnost AST

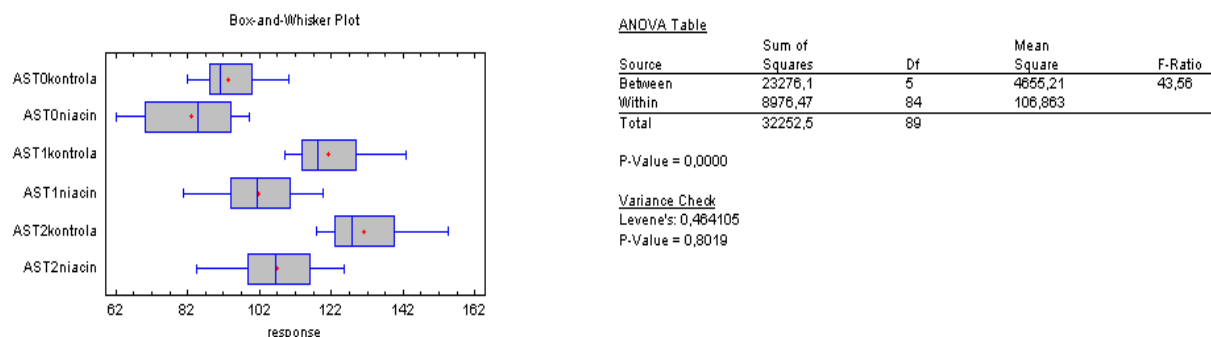


Tabela 45: LSD test razlika u vrednosti AST između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

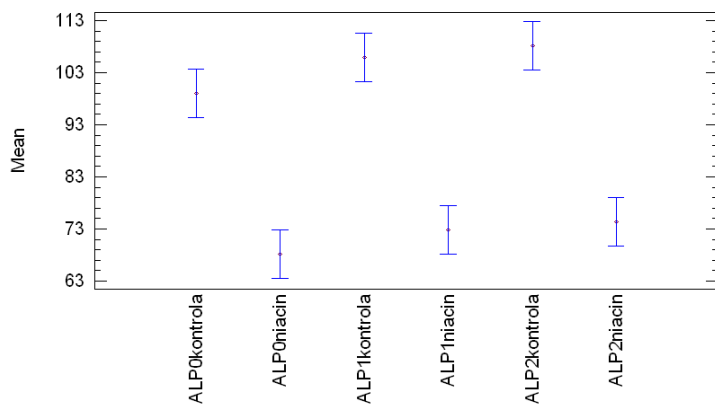
Contrast	Sig.	Difference
AST0kontrola - AST0niacin	p<0,01	10,2
AST0kontrola - AST1kontrola	p<0,01	-27,8467
AST0kontrola - AST1niacin	p<0,05	-8,33333
AST0kontrola - AST2kontrola	p<0,01	-37,542
AST0kontrola - AST2niacin	p<0,01	-13,4173
AST0niacin - AST1kontrola	p<0,01	-38,0467
AST0niacin - AST1niacin	p<0,01	-18,5333
AST0niacin - AST2kontrola	p<0,01	-47,742
AST0niacin - AST2niacin	p<0,01	-23,6173
AST1kontrola - AST1niacin	p<0,01	19,5133
AST1kontrola - AST2kontrola	p<0,01	-9,69533
AST1kontrola - AST2niacin	p<0,01	14,4293
AST1niacin - AST2kontrola	p<0,01	-29,2087
AST1niacin - AST2niacin	NS	-5,084
AST2kontrola - AST2niacin	p<0,01	24,1247

Vrednost ALP je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $99,07 \pm 14,13$; $68,13 \pm 9,79$ (teljenje, nulta nedelja); $106 \pm 15,12$; $72,9 \pm 10,48$ (prva nedelja) i $108,12 \pm 15,43$; $74,36 \pm 10,68$ IU/L (druga nedelja) (Tabela 46, Grafikon 38). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost ALP ($F=30,30$; $p<0,0001$) (Grafikon 39, Tabela 47). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost ALP u svim nedeljama ogleđa u odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj nedelje na vrednost ALP nije utvrđen, ali je postojala tendencija porasta aktivnosti ovog enzima u krvi (Tabela 48).

Tabela 46: Deskriptivna statistika za aktivnost ALP u krvi (IU/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
ALP0kontrola	15	99,0667	14,1344	14,2676%	79,0	126,0	47,0
ALP0niacin	15	68,1333	9,78969	14,3684%	55,0	83,0	28,0
ALP1kontrola	15	106,001	15,1238	14,2676%	84,53	134,82	50,29
ALP1niacin	15	72,9027	10,475	14,3684%	58,85	88,81	29,96
ALP2kontrola	15	108,122	15,4279	14,269%	86,22	137,52	51,3
ALP2niacin	15	74,3607	10,6846	14,3686%	60,03	90,59	30,56
Total	90	88,0978	20,8547	23,6722%	55,0	137,52	82,52

Grafikon 38: Prosečna vrednost \pm SD za aktivnost ALP u ogleđnoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 39 i Tabela 47: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na aktivnost ALP

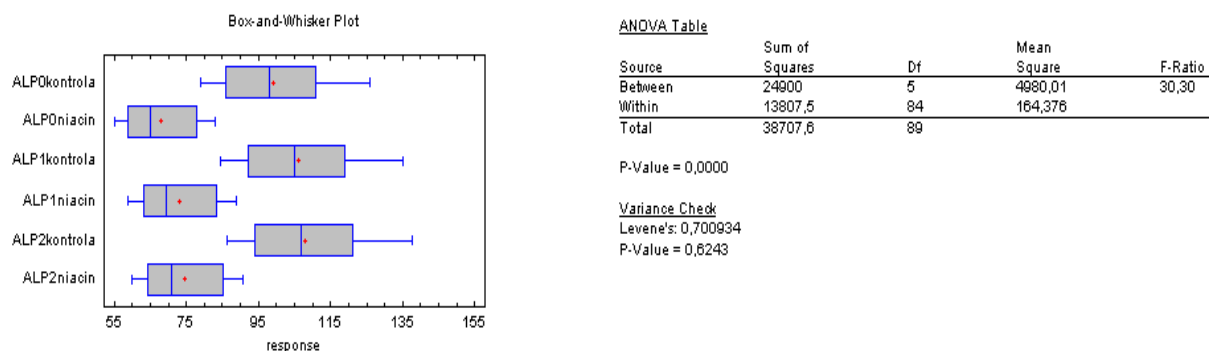


Tabela 48:LSD test razlika u vrednosti ALP između različitih eksperimetalnih grupa za ANOVA analizu

Contrast	Sig.	Difference
ALP0kontrola - ALP0niacin	p<0,01	30,9333
ALP0kontrola - ALP1kontrola	NS	-6,93467
ALP0kontrola - ALP1niacin	p<0,01	26,164
ALP0kontrola - ALP2kontrola	NS	-9,05533
ALP0kontrola - ALP2niacin	p<0,01	24,706
ALP0niacin - ALP1kontrola	p<0,01	-37,868
ALP0niacin - ALP1niacin	NS	-4,76933
ALP0niacin - ALP2kontrola	p<0,01	-39,9887
ALP0niacin - ALP2niacin	NS	-6,22733
ALP1kontrola - ALP1niacin	p<0,01	33,0987
ALP1kontrola - ALP2kontrola	NS	-2,12067
ALP1kontrola - ALP2niacin	p<0,01	31,6407
ALP1niacin - ALP2kontrola	p<0,01	-35,2193
ALP1niacin - ALP2niacin	NS	-1,458
ALP2kontrola - ALP2niacin	p<0,01	33,7613

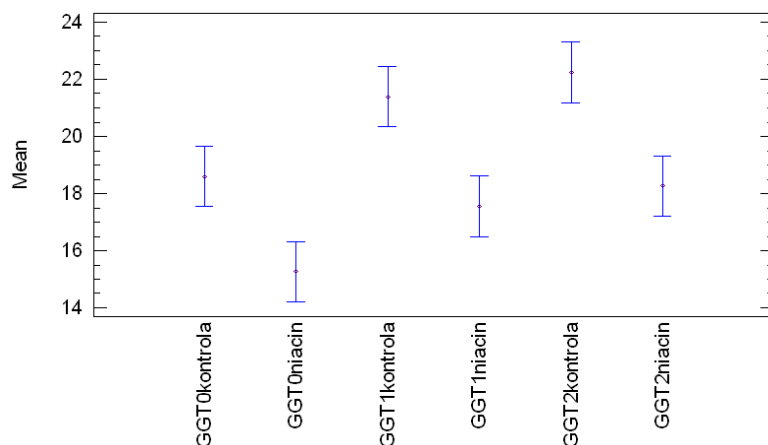
Vrednost GGT je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $18,6 \pm 2,26$; $15,27 \pm 2,91$ (teljenje, nulta nedelja); $21,39 \pm 2,6$; $17,56 \pm 3,35$ (prva nedelja) i $22,25 \pm 2,7$; $18,26 \pm 3,49$ IU/L (druga nedelja) (Tabela 49, Grafikon 40). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost GGT ($F=11,59$; $p<0,0001$) (Grafikon 41, Tabela 50). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost GGT u svim nedeljama ogleđa u odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj nedelje je takođe utvrđen, tako što je aktivnost GGT bila

značajno viša u nedeljama posle teljenja u odnosu na nedelju teljenja, ali nisu utvrđene značajne razlike u vrednostiGGT u prvoj i drugoj nedelji posle teljenjau obe grupe krava (Tabela 51).

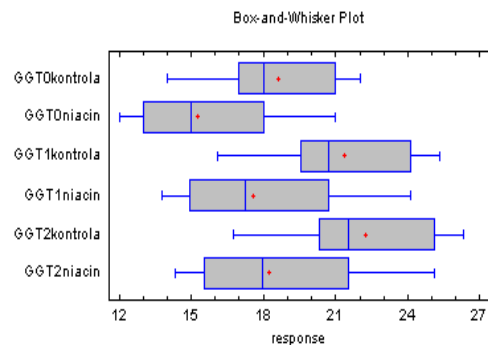
Tabela 49:Deskriptivna statistika za aktivnost GGT u krvi (IU/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
GGT0kontrola	15	18,6	2,26148	12,1585%	14,0	22,0	8,0
GGT0niacin	15	15,2667	2,91466	19,0917%	12,0	21,0	9,0
GGT1kontrola	15	21,39	2,6007	12,1585%	16,1	25,3	9,2
GGT1niacin	15	17,5567	3,35186	19,0917%	13,8	24,15	10,35
GGT2kontrola	15	22,2467	2,70525	12,1602%	16,74	26,31	9,57
GGT2niacin	15	18,2587	3,48718	19,0988%	14,35	25,12	10,77
Total	90	18,8864	3,68539	19,5134%	12,0	26,31	14,31

Grafikon 40: Prosečna vrednost±SD za aktivnost GGT u ogleđnoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 41 i Tabela 50:ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na aktivnost GGT



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	493,592	5	98,7184	11,59
Within	715,217	84	8,51449	
Total	1208,81	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 0,549009
P-Value = 0,7386

Tabela 51: LSD test razlika u aktivnosti GGT između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

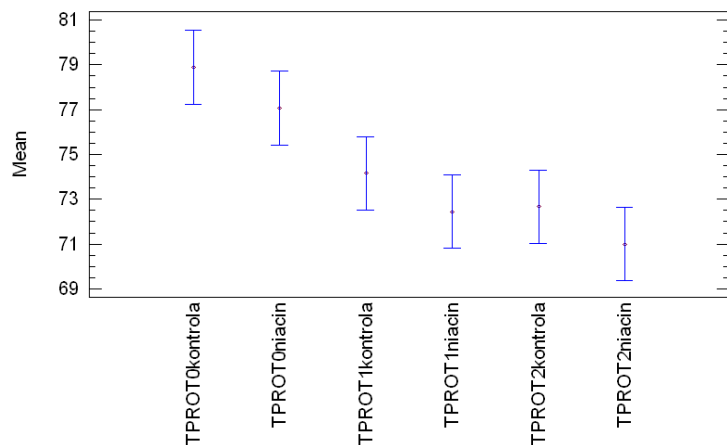
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
GGT0kontrola - GGT0niacin	p<0,01	3,33333
GGT0kontrola - GGT1kontrola	p<0,05	-2,79
GGT0kontrola - GGT1niacin	NS	1,04333
GGT0kontrola - GGT2kontrola	p<0,01	-3,64667
GGT0kontrola - GGT2niacin	NS	0,341333
GGT0niacin - GGT1kontrola	p<0,01	-6,12333
GGT0niacin - GGT1niacin	p<0,05	-2,29
GGT0niacin - GGT2kontrola	p<0,01	-6,98
GGT0niacin - GGT2niacin	p<0,05	-2,992
GGT1kontrola - GGT1niacin	p<0,01	3,83333
GGT1kontrola - GGT2kontrola	NS	-0,856667
GGT1kontrola - GGT2niacin	p<0,01	3,13133
GGT1niacin - GGT2kontrola	p<0,01	-4,69
GGT1niacin - GGT2niacin	NS	-0,702
GGT2kontrola - GGT2niacin	p<0,01	3,988

Koncentracija ukupnih proteina se nije značajno razlikovala kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: 78,89±4,92:77,08±4,57 (teljenje, nulta nedelja); 74,15±4,6:72,45±4,29 (prva nedelja) i 72,67±4,53:71±4,2g/L (druga nedelja) (Tabela 52, Grafikon 42). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja ima značajan uticaj na vrednost ukupnih proteina (F=6,68; p<0,0001) (Grafikon 43, Tabela 53). LSD test pokazuje da je od nedelje teljenja u naredne dve nedelje opadala vrednost ukupnih proteina u obe grupe krava (Tabela 54).

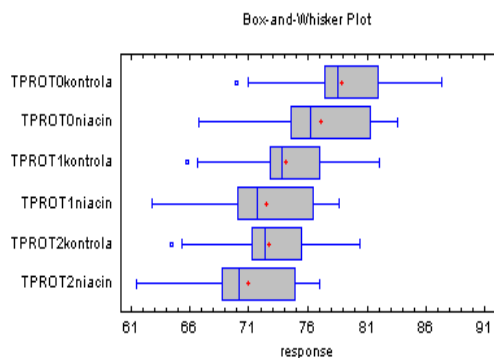
Tabela 52: Deskriptivna statistika za koncentraciju ukupnih proteina u krvi (g/L)

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
TPROT0kontrola	15	78,888	4,92285	6,24031%	70,0	87,3	17,3
TPROT0niacin	15	77,0767	4,56844	5,92714%	66,75	83,6	16,85
TPROT1kontrola	15	74,154	4,62781	6,24082%	65,8	82,06	16,26
TPROT1niacin	15	72,4513	4,2927	5,92495%	62,75	78,58	15,83
TPROT2kontrola	15	72,6713	4,5353	6,24084%	64,48	80,42	15,94
TPROT2niacin	15	71,0013	4,20782	5,92639%	61,49	77,01	15,52
Total	90	74,3738	5,20439	6,99762%	61,49	87,3	25,81

Grafikon 42: Prosečna vrednost \pm SD za koncentraciju ukupnih proteina u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 43 i Tabela 53: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na koncentraciju kupnih proteina



ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	685,494	5	137,099	6,68
Within	1725,13	84	20,5373	
Total	2410,63	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check

Levene's: 0,0255781

P-Value = 0,9997

Tabela 54: LSD test razlika koncentracije ukupnih proteina između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

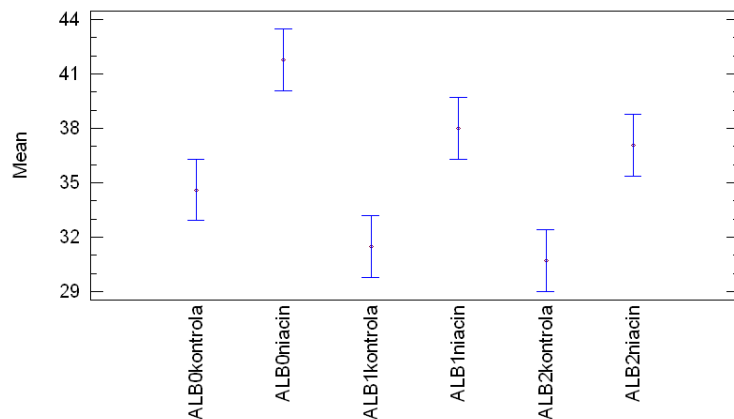
Contrast	Sig.	Difference
TPROT0kontrola - TPROT0niacin	NS	1,81133
TPROT0kontrola - TPROT1kontrola	p<0,01	4,734
TPROT0kontrola - TPROT1niacin	p<0,01	6,43667
TPROT0kontrola - TPROT2kontrola	p<0,01	6,21667
TPROT0kontrola - TPROT2niacin	p<0,01	7,88667
TPROT0niacin - TPROT1kontrola	NS	2,92267
TPROT0niacin - TPROT1niacin	p<0,01	4,62533
TPROT0niacin - TPROT2kontrola	p<0,01	4,40533
TPROT0niacin - TPROT2niacin	p<0,01	6,07533
TPROT1kontrola - TPROT1niacin	NS	1,70267
TPROT1kontrola - TPROT2kontrola	NS	1,48267
TPROT1kontrola - TPROT2niacin	NS	3,15267
TPROT1niacin - TPROT2kontrola	NS	-0,22
TPROT1niacin - TPROT2niacin	NS	1,45
TPROT2kontrola - TPROT2niacin	NS	1,67

Koncentracija albumina je bila značajno višakod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $34,6 \pm 3,56$: $41,78 \pm 6,14$ (teljenje, nulta nedelja); $31,49 \pm 3,24$: $38,02 \pm 5,58$ (prva nedelja) i $30,7 \pm 3,16$: $37,07 \pm 5,44$ g/L (druga nedelja) (Tabela 55, Grafikon 44). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost albumina ($F=12,03$; $p<0,0001$) (Grafikon 45, Tabela 56). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju višu vrednost albumina u svim nedeljama ogleda u odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj nedelje je takođe utvrđen, tako što je koncentracija albumina bila značajno niža u nedeljama posle teljenja u odnosu na nedelju teljenja, ali nisu utvrđene značajne razlike u vrednosti albumina u prvoj i drugoj nedelji posle teljenja u obe grupe krava (Tabela 57).

Tabela 55: Deskriptivna statistika za koncentraciju albumina u krvi (g/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
ALB0kontrola	15	34,6067	3,564	10,2986%	27,6	40,6	13,0
ALB0niacin	15	41,78	6,13633	14,6872%	30,6	50,7	20,1
ALB1kontrola	15	31,4927	3,24328	10,2985%	25,12	36,95	11,83
ALB1niacin	15	38,0193	5,58352	14,686%	27,85	46,14	18,29
ALB2kontrola	15	30,7047	3,16235	10,2992%	24,49	36,02	11,53
ALB2niacin	15	37,068	5,44456	14,688%	27,15	44,98	17,83
Total	90	35,6119	5,96247	16,7429%	24,49	50,7	26,21

Grafikon 44: Prosečna vrednost \pm SD za koncentraciju albumina u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 45 i Tabela 56: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na koncentraciju albumina

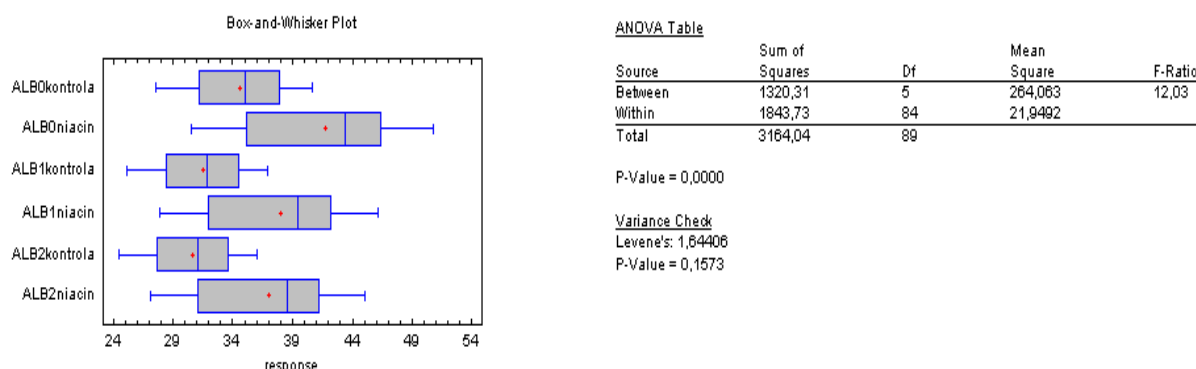


Tabela 57: LSD test razlika koncentracije albumina između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

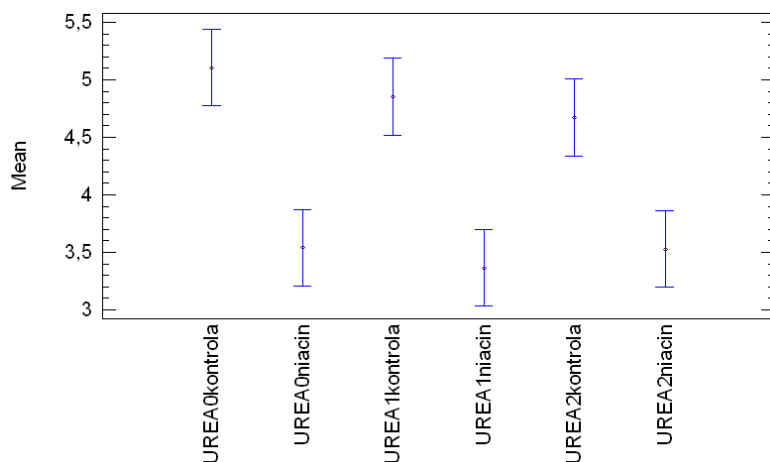
Contrast	Sig.	Difference
ALB0kontrola - ALB0niacin	p<0,01	-7,17333
ALB0kontrola - ALB1kontrola	NS	3,114
ALB0kontrola - ALB1niacin	p<0,05	-3,41267
ALB0kontrola - ALB2kontrola	p<0,05	3,902
ALB0kontrola - ALB2niacin	NS	-2,46133
ALB0niacin - ALB1kontrola	p<0,01	10,2873
ALB0niacin - ALB1niacin	p<0,05	3,76067
ALB0niacin - ALB2kontrola	p<0,01	11,0753
ALB0niacin - ALB2niacin	p<0,01	4,712
ALB1kontrola - ALB1niacin	p<0,01	-6,52667
ALB1kontrola - ALB2kontrola	NS	0,788
ALB1kontrola - ALB2niacin	p<0,01	-5,57533
ALB1niacin - ALB2kontrola	p<0,01	7,31467
ALB1niacin - ALB2niacin	NS	0,951333
ALB2kontrola - ALB2niacin	p<0,01	-6,36333

Koncentracija uree je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $5,1 \pm 1,2$; $3,54 \pm 0,7$ (teljenje, nulta nedelja); $4,85 \pm 1,12$; $3,36 \pm 0,64$ (prva nedelja) i $4,67 \pm 1,08$; $3,53 \pm 0,67$ mmol/L (druga nedelja) (Tabela 58, Grafikon 46). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost uree ($F=10,79$; $p<0,0001$) (Grafikon 47, Tabela 59). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost uree u svim nedeljama ogleđa u odnosu na kontrolnu grupu. Uticaj nedelje je takođe utvrđen, tako što je koncentracija uree bila značajno niža u nedeljama posle teljenja u odnosu na nedelju teljenja ali ove razlike nisu utvrđene u grupi krava koje su primale niacin (Tabela 60).

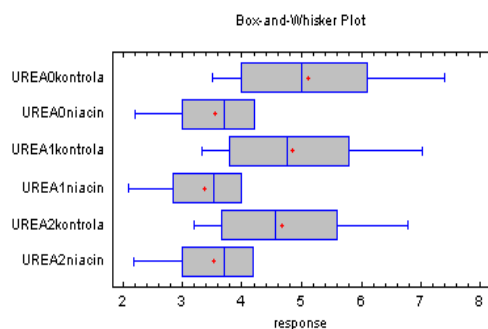
Tabela 58: Deskriptivna statistika za koncentraciju uree u krvi (mmol/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
UREA0kontrola	15	5,10667	1,17563	23,0214%	3,5	7,4	3,9
UREA0niacin	15	3,54	0,669541	18,9136%	2,2	4,2	2,0
UREA1kontrola	15	4,854	1,11695	23,011%	3,33	7,03	3,7
UREA1niacin	15	3,36467	0,636709	18,9234%	2,09	3,99	1,9
UREA2kontrola	15	4,67133	1,07553	23,0241%	3,2	6,77	3,57
UREA2niacin	15	3,53	0,669541	18,9672%	2,19	4,19	2,0
Total	90	4,17778	1,14659	27,4451%	2,09	7,4	5,31

Grafikon 46: Prosečna vrednost \pm SD za koncentraciju uree u ogleđnoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 47 i Tabela 59: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na koncentraciju uree



Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	46,7685	5	9,1537	10,79
Within	71,2378	84	0,84807	
Total	117,006	89		

P-Value = 0,0000

Variance Check
Levene's: 3,37753
P-Value = 0,0079

Tabela 60: LSD test razlika koncentracije uree između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

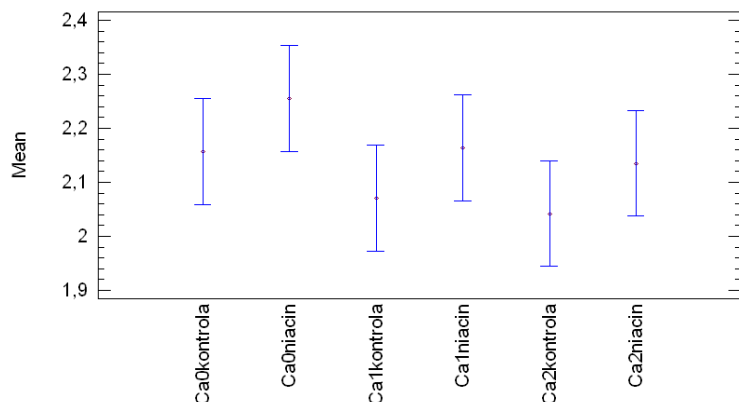
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
UREA0kontrola - UREA0niacin	p<0,01	1,56667
UREA0kontrola - UREA1kontrola	NS	0,252667
UREA0kontrola - UREA1niacin	p<0,01	1,742
UREA0kontrola - UREA2kontrola	NS	0,435333
UREA0kontrola - UREA2niacin	p<0,01	1,57667
UREA0niacin - UREA1kontrola	p<0,01	-1,314
UREA0niacin - UREA1niacin	NS	0,175333
UREA0niacin - UREA2kontrola	p<0,01	-1,13133
UREA0niacin - UREA2niacin	NS	0,01
UREA1kontrola - UREA1niacin	p<0,01	1,48933
UREA1kontrola - UREA2kontrola	NS	0,182667
UREA1kontrola - UREA2niacin	p<0,01	1,324
UREA1niacin - UREA2kontrola	p<0,01	-1,30667
UREA1niacin - UREA2niacin	NS	-0,165333
UREA2kontrola - UREA2niacin	p<0,01	1,14133

Aplikacija niacina nije imala statistički signifikantan uticaj na koncentraciju kalcijuma u krvi iako su krave koje su primale niacin imale tendenciju više koncentracije kalcijuma u odnosu na kontrolnu grupu (mmol/l). ANOVA analizom i LSD testom nije utvrđen značajan uticaj aplikacije niacina ni vremena uzotkovanja krvi kod krava ($F=1,18$; $p>0,05$; NS). Rezultati su prikazani u Tabelama 61 i 62 i na Grafikonima 48 i 49.

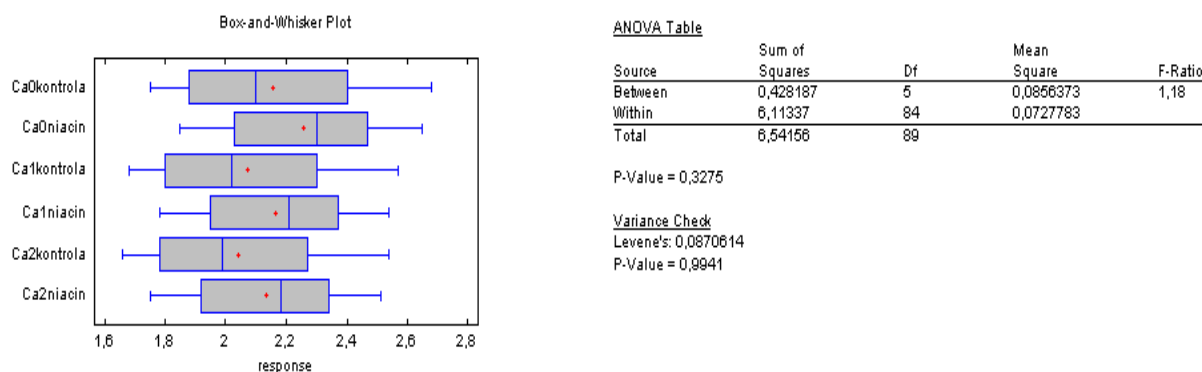
Tabela 61: Deskriptivna statistika za koncentraciju kalcijuma u krvi (mmol/L)

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
Ca0kontrola	15	2,15667	0,293152	13,5928%	1,75	2,68	0,93
Ca0niacin	15	2,25533	0,263028	11,6625%	1,85	2,65	0,8
Ca1kontrola	15	2,07067	0,281005	13,5708%	1,68	2,57	0,89
Ca1niacin	15	2,164	0,252156	11,6523%	1,78	2,54	0,76
Ca2kontrola	15	2,042	0,277442	13,5868%	1,66	2,54	0,88
Ca2niacin	15	2,13533	0,249052	11,6634%	1,75	2,51	0,76
Total	90	2,13733	0,27111	12,6845%	1,66	2,68	1,02

Grafikon 48: Prosečna vrednost \pm SD za koncentraciju kalcijuma u oglednoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 49 i Tabela 62: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na koncentraciju kalcijuma

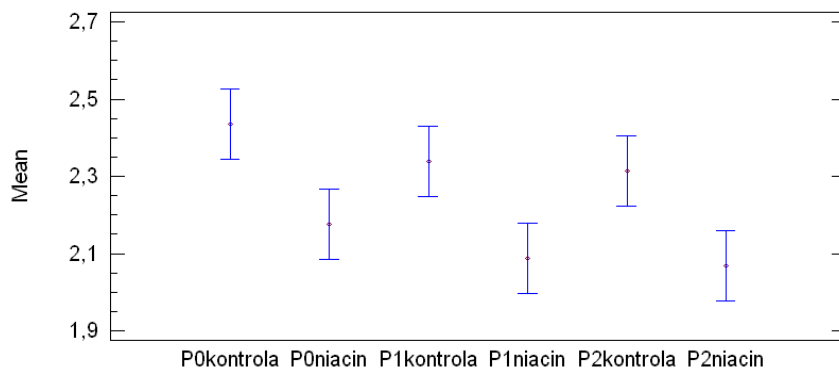


Koncentracija fosfora je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $2,43 \pm 0,26$; $2,17 \pm 0,25$ (teljenje, nulta nedelja); $2,34 \pm 0,25$; $2,09 \pm 0,24$ (prva nedelja) i $2,31 \pm 0,25$; $2,07 \pm 0,24$ mmol/L (druga nedelja) (Tabela 63, Grafikon 50). ANOVA analiza pokazuje da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na vrednost fosfora ($F=5,23$; $p<0,0001$) (Grafikon 51, Tabela 64). LSD test pokazuje da krave koje su primale niacin imaju nižu vrednost fosfora u svim nedeljama ogleđa u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, uticaj nedelje na vrednost fosfora u okviru ogledne ili kontrolne grupe posebno nije utvrđen (Tabela 65).

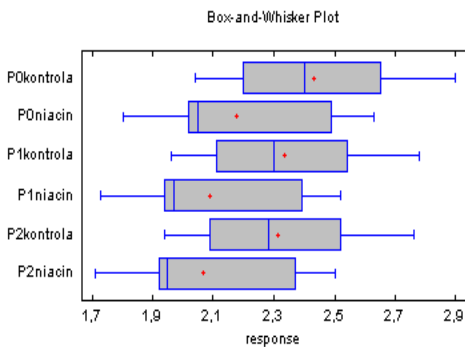
Tabela 63: Deskriptivna statistika za koncentraciju fosfora u krvi (mmol/L)

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
P0kontrola	15	2,43467	0,263598	10,8269%	2,04	2,9	0,86
P0niacin	15	2,17467	0,25343	11,6537%	1,8	2,63	0,83
P1kontrola	15	2,33733	0,251835	10,7745%	1,96	2,78	0,82
P1niacin	15	2,08867	0,242395	11,6052%	1,73	2,52	0,79
P2kontrola	15	2,31467	0,250766	10,8338%	1,94	2,76	0,82
P2niacin	15	2,068	0,241341	11,6703%	1,71	2,5	0,79
Total	90	2,23633	0,278892	12,471%	1,71	2,9	1,19

Grafikon 50: Prosečna vrednost \pm SD za koncentraciju uree u ogleđnoj i kontrolnoj grupi u nedeljama ispitivanja



Grafikon 51 i Tabela 64: ANOVA analiza uticaj aplikacije niacina i nedelje uzorkovanja na koncentraciju fosfora u krvi



Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between	1,64426	5	0,328853	5,23
Within	5,27823	84	0,062836	
Total	6,92249	89		

P-Value = 0,0003

Variance Check
Levene's: 0,118711
P-Value = 0,9879

Tabela 65: LSD test razlika koncentracije fosfora između različitih eksperimentalnih grupa za ANOVA analizu

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
P0kontrola - P0niacin	p<0,05	0,26
P0kontrola - P1kontrola	NS	0,0973333
P0kontrola - P1niacin	p<0,01	0,346
P0kontrola - P2kontrola	NS	0,12
P0kontrola - P2niacin	p<0,01	0,366667
P0niacin - P1kontrola	NS	-0,162667
P0niacin - P1niacin	NS	0,086
P0niacin - P2kontrola	NS	-0,14
P0niacin - P2niacin	NS	0,106667
P1kontrola - P1niacin	p<0,05	0,248667
P1kontrola - P2kontrola	NS	0,0226667
P1kontrola - P2niacin	p<0,01	0,269333
P1niacin - P2kontrola	p<0,05	-0,226
P1niacin - P2niacin	NS	0,0206667
P2kontrola - P2niacin	p<0,05	0,246667

5.4 Uticaj aplikacije niacina na povezanost metaboličkih parametara sa stepenom lipolize i ketogeneze

Ispitivanja pokazuju da NAD i NADP koreliraju sa svim ispitanim metaboličkim parametrima. Nije utvrđena značajna korelacija između ukupnih proteina i NAD i kalcijuma i NADP. Rezultati su prikazani u Tabeli 66. U drugom koraku ispitali smo korelaciju između metaboličkih parametara sa najznačajnijim pokazateljima metaboličkog stresa u ranoj laktaciji – lipolizom (NEFA) i ketogenezom (BHB). Utvrđene su značajne korelacije sa većinom ispitivanih parametara. Nije utvrđena značajna korelacija ukupnih proteina sa NEFA i fosfora sa BHB. Rezultati su prikazani u tabeli 67.

Parcijalna korelacija pokazuje da vitamerni niacina mogu objasniti određeni deo korelacije koji postoji između NEFA i BHB sa metaboličkim parametrima (Grafikon 52).

Grafički prikaz korelacionih veza svih ispitivanih parametara prikazan je na Grafikonu 53.

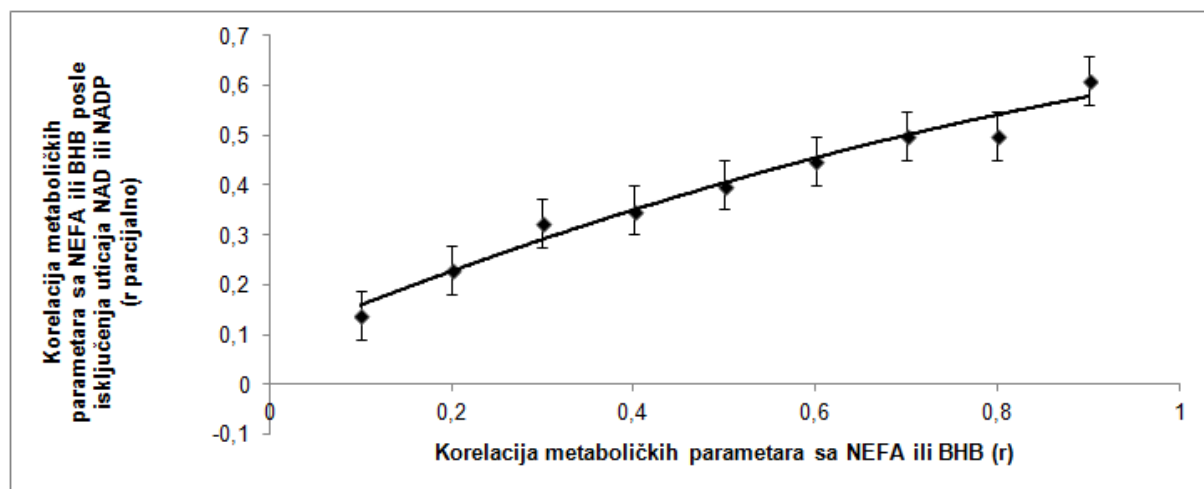
Tabela 66: Isitivanje korelacije NAD i NADP sa metabolitima

	NAD	NADP
NEFA	-0,6829**	-0,6375**
BHB	-0,4398**	-0,3657**
Glukoza	0,6897**	0,5207**
INSULIN	0,8055**	0,6720**
TGC	0,6002**	0,5064**
HOL	0,6434**	0,6080**
MDA	-0,5931**	-0,5366**
TBIL	-0,5670**	-0,5160**
AST	-0,4861**	-0,4123**
ALP	-0,7101**	-0,7316**
GGT	-0,4139**	-0,4397**
TPROT	-0,0821 ^{NS}	-0,2133*
ALB	0,5658**	0,5959**
Urea	-0,6901**	-0,5461**
Ca	0,2422*	0,1545 ^{NS}
P	-0,3918*	-0,4089**

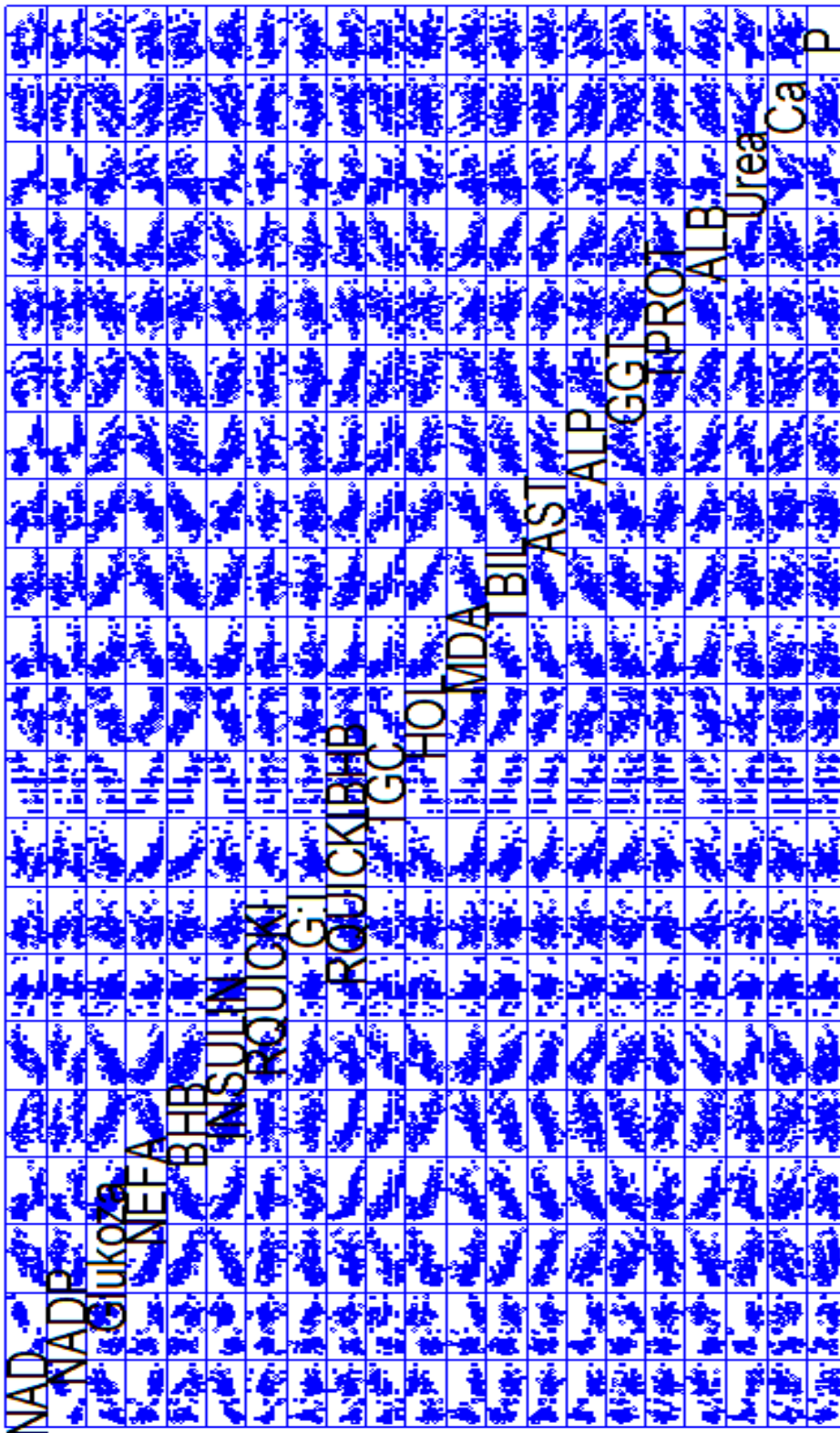
Tabela 67: Ispitivanje korelacije između NEFA i BHB sa parametrima metaboličkog profila krava

	NEFA	BHB
Glukoza	-0,7267**	-0,7185**
INSULIN	-0,7232**	-0,5660**
TGC	-0,7609**	-0,7477**
HOL	-0,7136**	-0,6579**
MDA	0,6313**	0,6257**
TBIL	0,7118**	0,6229**
AST	0,6636**	0,6802**
ALP	0,6528**	0,4168**
GGT	0,5735**	0,6401**
TPROT	-0,1418 ^{NS}	-0,2531*
ALB	-0,5261**	-0,4801**
Urea	0,5277**	0,2887*
Ca	-0,2611*	-0,3439**
P	0,3037**	0,0528 ^{NS}

Grafikon 52: Odnos nulte parcijalne korelacijemetaboličkih parametara sa NEFA i BHB uz kontrolu NAD i NADP



Grafikon 53: Grafički prikaz korelacionog matriksa svih ispitivanih parametara



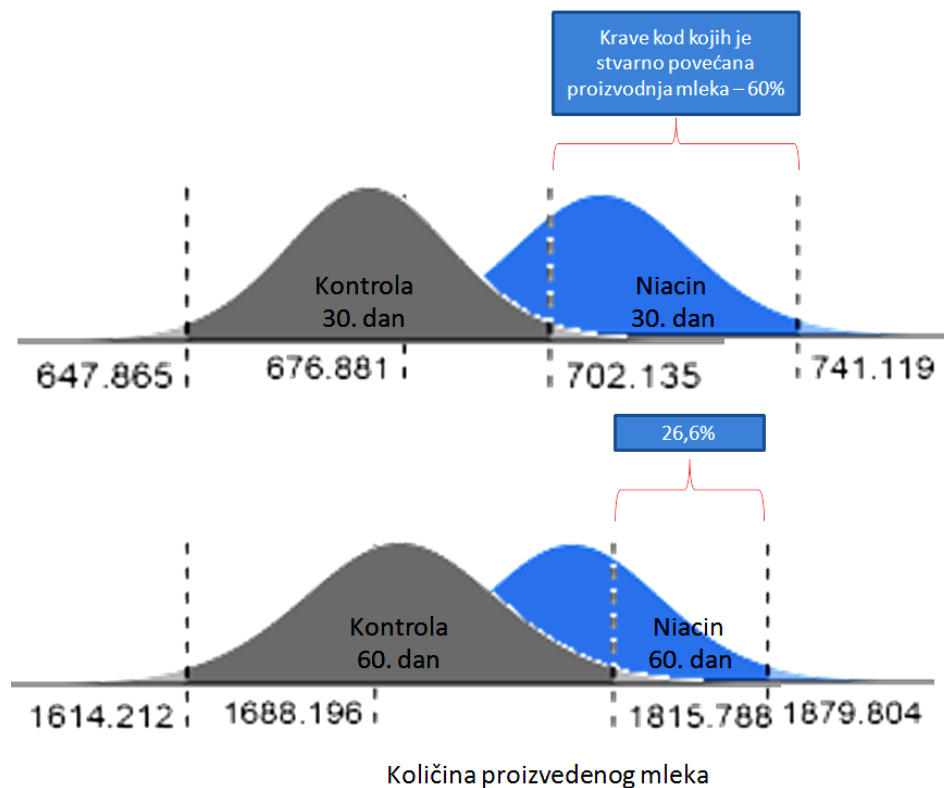
5.5 Uticaj aplikacije niacina na proizvodnju mleka kod krava u ranoj laktaciji

Aplikacija niacina nije statistički značajno uticala na proizvodnju mleka. Ipak, aplikacija niacina pokazuje tendenciju pozitivnog delovanja na proizvodnju mleka do 30. dana laktacije ($p < 0,1$), ali se ova tendencija gubi ako posmatramo širi period od partusa do 60. dana laktacije (Tabela 68). Iako nije bilo statistički značajne razlike u proizvodnji mleka, sa praktičnog aspekta je značajno odrediti koji je to procenat krava u grupi koja je primala niacin koji je imao statistički značajno veću proizvodnju mleka u odnosu na grupu krava koja nije primala niacin. Analizom distribucija frekvencije, beta greške i statističke snage testa izračunato je da je 60% krava pokazalo statistički značajno veću proizvodnju mleka u grupi krava koja je primala niacin u odnosu na kontrolu, ali se sa napredovanjem laktacije taj procenat smanjuje, pa 60. dana laktacije imamo samo 26,6% krava koje su pokazale značajno veću proizvodnju mleka u odnosu na kontrolu (Grafikon 54).

Tabela 68: Proizvodnja mleka kod krava koje su primale niacin i u kontrolnoj grupi

Količina proizvedenog mleka kumulativno	Niacin	Kontrola	p	Krave koje su primale niacin i kod kojih je došlo do stvarnog povećanja proizvodnje mleka (%)
0-30. dan	725±49	650±51	<0,1	60,0
0-60. dan	1784±173	1715±182	>0,1	26,6

Grafikon 54: Poređenje distribucija frekvencije ukupne proizvodnje mleka 30. i 60.dana laktacije kod ogleadne i kontrolne grupe krava



Ogled 2 – Ispitivanje povezanosti morfometrijskih karakteristika hepatocita, adipocita i vitamina niacina kod krava isključenih iz proizvodnje tokom rane laktacije

5.6 Uticaj statusa niacina na morfometrijska svojstva hepatocita i adipocita

Ispitivanja su pokazala da krave sa boljim statusom niacina (veća vrednost NAD i NADP) imaju manji dijametar masnih vakuola u hepatocitima, manju optičku gustinu ovih vakuola, uz povećan dijametar jedra hepatocita i njegovu optičku gustinu. Nađena je i pozitivna korelacija između vrednosti NAD i dijametra adipocita, ali ne i njihove optičke gustine. Interesantan je nalaz da sa povećanjem dimenzije adipocita opadaju dimenzije masnih vakuola u hepatocitima, a raste optička gustina jedra. Ovakvi nalazi potvrđuju značaj niacina u suprimiranju lipolize i zaštite krava od metaboličkih bolesti kao što je masna jetra. Deskriptivni rezultati za izmerene parametre prikazan je u Tabeli 69. Korelacija između parametara prikazana

je u vidu brojčanog i grafičkog korelacionog matriksa u tabeli 70 i na grafikonu 55. Slike 1 i 2 predstavljaju slike hepatocita sa najvišim i najnižim statusom niacina, odnosno vrednostima NAD i NADP.

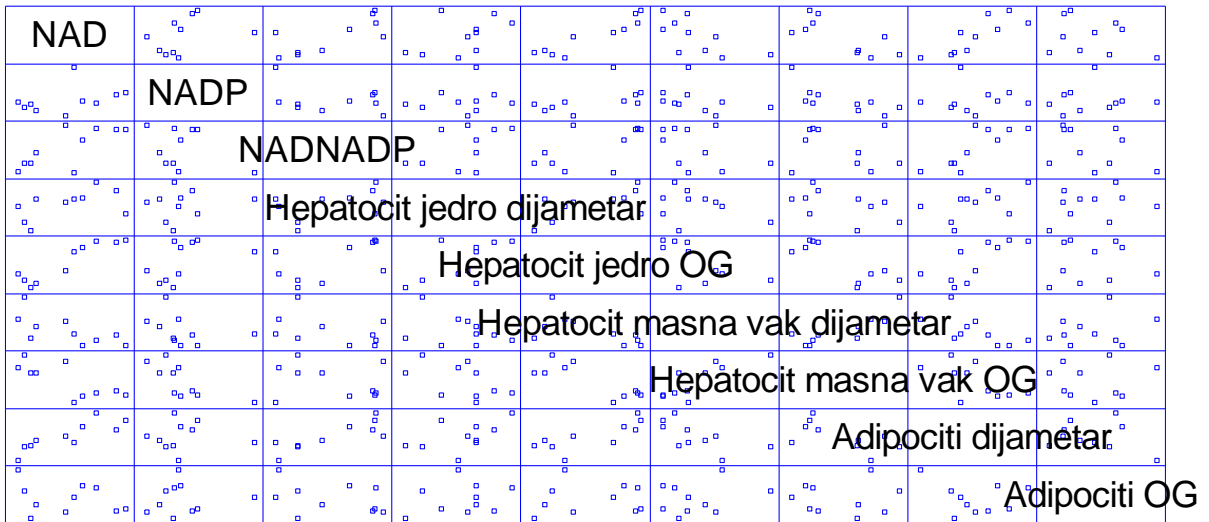
Tabela 69: Deskriptivni rezultati istraživanja morfometrijskih osobina hepatocita i adipocita i statusa niacina

	NAD	NADP	NADNA DP	Hepatocit jedro dijametar	Hepatocit jedro OG	Hepatocit masna vak dijametar	Hepatocit masna vak OG	Adiociti dijametar	Adipociti OG
Count	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Average	553,4	328,7	1,706	5,0062	325601	5,2036	1,50796E6	103,8	474483,
Standard deviation	129,9	61,53	0,386	0,809333	160721	1,202	795238	10,2502	57667,9
Coeff. of variation	23,4%	18,7%	22,648%	16,6%	49,3%	23,1%	52,74%	9,85%	12,15%
Minimum	390	255	1,2	3,556	104931	3,956	464944,	86,0	399931
Maximum	750	480	2,16	6,24	512012	7,889	2,73598E6	121,0	585525
Range	360	225,0	0,96	2,68	407081	3,933	2,27104E6	35,0	185594

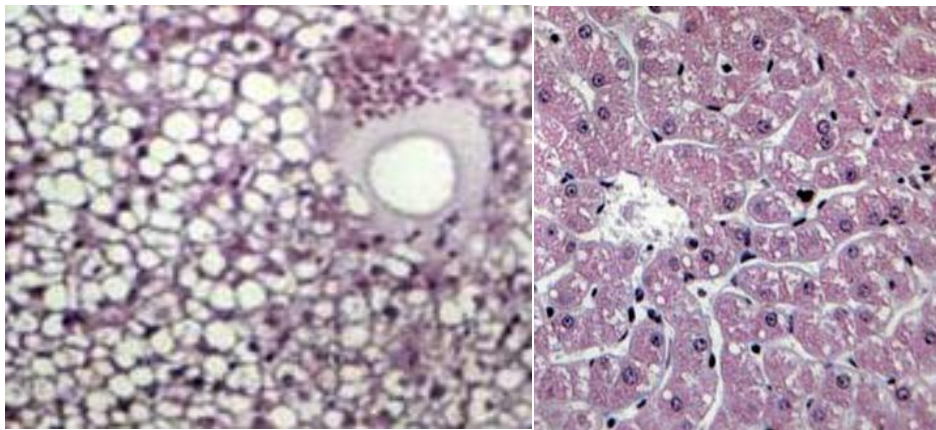
Tabela 70: Ispitivanje korelacije između morfometrijskih karakteristika hepatocita, adipocita, NAD i NADP

	NAD	NADP	NAD/NADP	Hepatocit jedro dijametar	Hepatocit jedro OG	Hepatocit masna vak dijametar	Hepatocit masna vak OG	Adipociti dijametar
NADP	0,35 ^{NS}							
NAD/NADP	0,75*	-0,34 ^{NS}						
Hepatocit jedro dijametar	0,50	0,14 ^{NS}	0,46 ^{NS}					
Hepatocit jedro OG	0,92**	0,48 ^{NS}	0,58 ^{NS}	0,62 ^{NS}				
Hepatocit masna vak dijametar	-0,67*	-0,34 ^{NS}	-0,42 ^{NS}	-0,32 ^{NS}	-0,61 ^{NS}			
Hepatocit masna vak OG	-0,75**	-0,72*	-0,24 ^{NS}	-0,50 ^{NS}	-0,82**	0,83**		
Adipociti dijametar	0,83**	0,01 ^{NS}	0,83**	0,51 ^{NS}	0,76*	-0,63*	-0,60 ^{NS}	
Adipociti OG	-0,29	0,05 ^{NS}	-0,35 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,08 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,02 ^{NS}	-0,23 ^{NS}

Grafikon 55: Grafički prikaz korelacionog matriksa korelacije između morfometrijskih karakteristika hepatocita, adipocita, NAD i NADP



Slika 1 i 2: Tipična slika masnog tkiva i hepatocita kod krava sa najnižim (levo) i najvišim (desno) statusom niacin



6.DISKUSIJA

6.1 Uticaj aplikacije niacina na vrednost njegovih vitamera u krvi

Vitamin B3 u formi nukleotida igra centralnu ulogu u metabolizmu, a brojne studije su demonstrirale da NAD ima važnu ulogu u raznim biološkim procesima kod sisara kao što su opstanak ćelija i apoptoza, diferencijacija, metabolizam ugljenih hidrata i masti.^{165,166,167} Takođe, postoji povezanost NAD sa oksidativnim stresom, pa tako u srčanom tkivu čoveka oksidativni stres indukuje smanjenje celularanih rezervnih zaliha NAD-a i što dovodi do smrti kardiomiocita.¹⁶⁸ Sa druge strane obnavljanje ovih zaliha NAD-a mogu da zaštite ćelije od povrede i izumiranja.¹⁶⁵ NAD može biti sintetizovan iz tri glavna prekursora i to *de novo* iz triptofana, ili intermedijarnim putevima od nikotinske kiseline ili nikotiamida, kod sisara uglavnom je NAD sintetizovan iz nikotinamida. Nikotinamid fosforibosiltransferaza (Nampt) je ključan biosintetski enzim koji inicira biosintezu NAD-a iz nikotinamida kod sisara. Studije pokazuju da je nivo ekspresije Nampt u korelaciji sa koncentracijom NAD⁺ u ćeliji.¹⁶⁹ Revollo i sar. (2004)¹⁶⁹ ukazuju na to da Nampt kontroliše koncentraciju NAD-a nezavisno od egzogenih izvora nikotinamida.

Prema podacima iz literature dvonedeljni tretman miševa sa visokim dozama nikotinske kiseline i nikotiamida (500 i 1000 mg/kg) ima uticaj na nivo NAD-a u raznim tkivima pa je nađena je povišena koncentracija NAD-a za 40 do 60% u krvi i u jetri.¹⁷⁰ To ukazuje na sposobnost niacina da stimuliše sintezu NAD-a u jetri i krvi i da se nikotiamid može konvertovati u alternativnoj formi i time povećati bioraspoloživost nikotiamida i/ili tretman nikotiamidom može izazivati ćelijsku adaptaciju koja dalje vodi do bolje biosinteze NAD-a.¹⁷¹ Jackson i sar. (1995)¹⁷⁰ su pokazali da nikotinska kiselina može povećati koncentraciju NAD-a u jetri i krvi, slično kao nikotinamid. U našem istraživanju dobijeni su rezultati gde je nakon aplikacije nikotinske kiseline vrednosti NAD-a kod krava iznosila 1724,6 pmol/L u nedelji teljenja, 1968,6 pmol/ml u prvoj nedelji nakon teljenja i 1724,6 pmol/L u drugoj nedelji što su značajno više vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu, 904.6 nultoj nedelji, 889.3 provj nedelji, 895.6 drugoj nedelji. Rezultati u našim istraživanjima pokazuju isto tako da nikotinska kiselina ima značajan uticaj na vrednosti koncentracije NADP i da krave koje su primile niacin imaju značajno višu koncentraciju NADP u svim nedeljama ispitivanja u odnosu na kontrolnu grupu.

Uticaj nikotinske kiseline na koncentracija NAD i NADP u krvi mogu se jasno uočiti i kada se uporede rezultati ogledene grupe u nedelju pre aplikacije niacina i nedelji teljenja odnosno nakon aplikacija niacina i zapazi se značajni rast vrednosti NAD-a i to od 862,3 mmol/L do 1724,6 mmol/L, i vrednosti NADP od 422,67 mmol/L na 704,45 mmol/L. Hara i sar. (2007)¹⁷² ukazuju na to da egzogena dodana nikotinska kiselina indukuje značajno povećanje celularnog nivoa NAD-a u humanim ćelijama dok nikotinamid dodan u istoj koncentraciji ne prouzrokuje značajno povećanje koncentracije NAD-a, pa su zaključili da je nikotinska kiselina bolji substrat za povećanje celularnog nivoa NAD-a od nikotinamida. Prema našim saznanjima u literaturi nisu dostupni podaci o uticaju nikotinamida ili nikotinske kiseline na nivo NAD-a kod preživara odnosno mlečnih krava i da su potrebna naknadna ispitivanja da bi se bolje istražio efekat niacina ne samo kao antilipolitički agens kod ovih životinja nego i efekat niacina na nivo NAD-a a stime i ukupnog metabolizma mlečnih krava sa posebnim osvrtom na oksidativni stres ćelija.

Eritrocitna koncentracija NAD-a i NADP-a je direktni pokazatelj funkcionalnog statusa niacin, jer pokazalo se da više reaguje na promjene u unosu niacina, tako što NAD/NADP odnos može biti koristan indikator za merenje statusa niacina kod ljudi (Fu i sar., 1989, Jacobson i sar., 1997).^{173,174} Kod ljudi koji su primali 50% manje od preporučljive dnevne doze niacina primećeno je smanjenje za 70% koncentracija NAD-a u roku od 5 nedelja, dok koncentracija NADP ostaje relativno konstantna.¹⁷³ U našim ispitivanjima odnos NAD/NADP nije pokazao statistički značajnu razliku između grupe koja je primila niacin i kontrolne grupe, no odnos NAD/NADP je značajno viši kod krava posle aplikacija niacina u odnosu na period pre aplikacija i odnos NAD/NADP značajno se stabilizuje kod grupe koja je primila niacin. Skoro sve krave ogledne grupe imale su NAD/NADP odnos viši od 2 imalo je samo kod krava koju su primili niacin. Odnos NAD/NADP koji je viši od 2.5, ukazuje na optimalan status niacin u organizmu.¹⁷⁵ Ovakve vrednosti NAD/NADP odnosa kod krava koje su primile niacin ukazuju na to da status niacina zavisi od njegove aplikacije niacina. U normalnim uslovima koncentracija eritrocitnog NAD je veća od koncentracije NADP, i zbog toga uvek odnos NAD/NADP treba da bude veći od 1.0.¹⁷⁶ Poznato je da je eritrocitna koncentracija NADP najčešće konstantna, a svaka redukcija eritrocitnog NAD redukuje NAD/NADP odnos i obratno.¹⁷³ Fu i sar. (1989)¹⁷³ sugerišu da svaki indeks niacina ispod 1.0 može biti indikacija za razvoj deficita niacina kod ljudi.

Izvedene vrednosti kao što su površina ispod krive ukazuju na statistički značajnu razliku vrednosti u oglednoj i kontrolnoj grupi. Postojanje razlike tokom vremena u odgovoru NAD i NADP mogu ukazati na mogućnost upotrebe ovih koenzima u proceni statusa niacina i time uticaj niacina na metaboličke promena kod krava nakon teljenja i procenjivanje potrebe za aplikacijom niacina kod krava sa niskim statusom niacina.

6.2 Uticaj aplikacije niacina na lipidni profil krava, glukozu, insulin i indekse insulinske rezistencije

Antilipolitički efekat niacina kod sisara je ispitivan još šezdesetih godina prošlog veka. Kanadski patolog Rudolf Altschul pre 60 godina pronalazi da nikotinska kiselina u višoj dozi smanjuje nivo holesterola u plazmi kod zečeva. Zato je Carlson (2005)³ opisao nikotinsku kiselinu kao jedinjenje sa dva lica jedno je vitamin a drugo je lipidni lek širokog spektra. Za razliku od nikotinske kiseline, nikotinamid ne deli ove osobine, on je samo vitamin. U narednim godinama urađen je niz kliničkih ispitivanja za antilipolitičko dejstvo nikotinske kiseline kod ljudi i drugih sisara da bi se utvrdila optimalna doza, sa ciljem da se maksimalno smanje nepoželjni efekti, kao i da bi se utvrdio mehanizam delovanja kao i drugi metabolički i klinički uticaji. Efekti nikotinske kiseline na lipidni metabolizam počinje da se ispituje i kod preživara u drugoj polovini prošlog veka. U 70-tim godinama Waterman i sar. (1972)¹⁷⁷ su aplikovali veliku količinu bolus doze (do 160 grama) nikotinske kiseline kod mlečnih krava, što je prouzrokovalo tranzitno smanjenje koncentracije NEFA.

Povećana lipidna mobilizacija i ketogeneza može dovesti do loše metaboličke adaptacije krava u peripartalnom periodu a to će se odraziti na celokupno zdravlje, produktivnost i blagostanje krava. Zato je mogućnost aplikacije niacina zbog njegovog antilipolitičkog svojstva u peripartalnom periodu kod krava predmet istraživanja dugi niz godina unazad. Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da je koncentracija NEFA kod krava kod kontrolne grupe u porastu i to 0.47 ± 0.09 nulta nedelja, 0.64 ± 0.15 prva nedelja i 0.76 ± 0.13 druga nedelja. Nađene su značajno niže vrednosti koncentracija NEFA kod krava koje su primale niacin 0.30 ± 0.09 nulte nedelje, 0.35 ± 0.1 prve nedelje i 0.39 ± 0.11 druge nedelje. Izražena mobilizacija NEFA iz adipoznog tkiva za vreme i nakon partusa kod visoko mlečnih krava je karakteristika metabolizma ovih životinja. Ovakva difuzija NEFA u krvotoku, obezbeđuje energiju tkivima u

celom telu, no njihov višak može biti i toksičan.¹⁷⁸ U preglednom artiklu Niehoff i sar. (2009)¹⁴⁰ u kome se analiziraju studije u kojima se koristi niacin koji nije zaštićen od razgradnje u rumenu došlo se do zaključka da NEFA može biti smanjena od nikotinske kiseline pod određenim uslovima ali ne i od nikotinamida. U veoma visokoj dozi nikotinska kiselina ima sposobnost da suprimira oslobađanje masti sa aktivacijom niacin receptora GPR109A.^{6, 76, 144} Koncentracija NEFA u plazmi bila je redukovana u samo jednoj od jedanaest studija kada se male doze slobodnog niacina daju kao suplemenat kod mlečnih krava.⁹ U našem istraživanju korišćen je niacin u dozi 100-120g krava/dan, koja omogućuje dostupnost u crevama 6-12 g niacina (5-10% dođe do tankih creva iz buraga) na dan u peripartalnom periodu u kome je lipidna mobilizacija najintenzivnija. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da u grupi krava koje su primile niacin u peripartalnom periodu imaju značajno niže vrednosti NEFA što je u skladu sa rezultatima drugih autora.^{5, 6, 76, 159.} Međutim, kod ovih autora aplikovan je inkapsuliran niacin kod krava u peripartalnim periodu ili su krave koju su bile na restriktivnoj ishrani primale abomazalnu infuziju niacina. Sa druge strane u metaanalizi gde su analizirane publikacije objavljene u periodu 1980-1998 godine u kome je aplikovan nezasićen niacin u maloj dozi kod mlečnih krava i pokazano je da nije imao efekta na redukciju NEFA.¹²⁷ Isti autori predlažu da buduća istraživanja niacina kod mlečnih krava budu u velikim dozama, uzimajući u obzir da prema Campbell i sar. (1994)¹²³ su utvrdili da 17% suplementiranog niacina dostiže do tankih creva kao slobodna nikotinska kiselina. Prema Santschi i sar. (2005)¹²⁰ procenat razgradnje niacina u rumenu kod mlečnih krava je 98.5% a kod tovnih goveda 93.8 %¹²⁶, ali u ovim istraživanjima uzete su samo duodenalne tečnosti a niacin se može naći i u čvrstoj frakciji iz crevne sadržine ili može biti absorbovan u proksimalnom duodenumu pre duodenalne kanile koja je korišćena u ogledu. Niehoff i sar. (2009)¹⁴⁰ ukazuju na to da ishrana i tip vitamina koji je aplikovan isto tako može imati uticaja. Obzirom da je postojala kontinuirana aplikacija niacina koja je počela daleko pre momenta uzimanja krvi i koja je nastavljena tokom i posle uzimanja uzoraka krvi, nismo našli ponovni skok vrednosti NEFA u nedeljama kada je vršeno uzorkovanje krvi.

Prema podacima iz literature značajna redukcija koncentracija BHB je nađena kod krava kojima je aplikovan niacin u odnosu sa kontrolnom grupom.^{153, 154} Nivo koncentracija BHB je u vezi sa nivoom koncentracije NEFA u krvi. Zbog svog metaboličkog kapaciteta niacina da suprimira mobilizaciju NEFA iz masnih depoa, smanjuje se koncentracija NEFA u krvi, što dovede do smanjenja Acetil-CoA, koji bi se kasnije koristio se za sintezu BHB.

Reesterifikovani trigliceridi u jetri su transportovani sa lipoproteinima vrlo male gustine (VLDL) do drugih tkiva. Ako sinteza triglicerida prevazilazi mogućnosti izvoza dolazi do masne infiltracije ili degeneracije jetre. Metabolizam holesterola kod mlečnih krava je pod uticajem hranljivih materija i nedostatka energije u zavisnosti od faze laktacije a može biti povezan i sa masnom jetrom.¹⁷⁹ U našim istraživanjima koncentracija holesterola je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja, isto tako i koncentracija triglicerida je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja (tabela 21 i tabela 18). Sa druge strane, u humanoj medicinu niacin je veoma upotrebljavan farmakološki agens sa širokom lipidnom spektrom. On smanjuje nivo totalnog holesterola i triglicerida u plazmi, odnosno koristi se kao lek za kontrolu lipidnih poremećaja kao što su hiperlipidemija i koronarna srčana obolenja (Carlson, 2005). Carlson (2005)³ kaže da se ovakvo dejstvo niacina na lipidni profil kod ljudi ostvaruje na taj način što smanjuje cirkulaciju NEFA i dovodi do smanjene konverzije NEFA u hepatične trigliceride a to prouzrokuje smanjen katabolizam na LDL i VLDL (LDL se formiraju u plazmi u toku katabolizma VLDL). Isto tako on navodi da niacin ima efekat i na nivo koncentracije HDL-lipoproteina velike gustine u plazmi i to tako što niacin povećava HDL u plazmi. Mehanizam kojim niacin povećava HDL je smanjenje stope kataboličke frakcije HDL-apoA-I, bez uticaja na stepen sinteze.¹⁸⁰ Poznato je da HDL ima funkciju suprotno onoj koju ima LDL, jer HDL preuzima holesterol sa površine ćelijske membrane i esterifikuje ga i ljudi koji imaju visok nivo koncentracije HDL su zaštićeni od ateroskleroze.¹⁸¹ Isto tako, pronađen je link za direkno delovanje niacina na sintezu triglicerida u jetri kod ljudi, tako što on inhibiše hepatocitnu diacilglicerol aciltransferazu, enzim koji je ključan u hepatičnoj sintezi triglicerida.¹⁸⁰ Međutim, metabolizam preživara razlikuje se od metabolizma drugih sisara, preživari prirodno imaju vrlo nisku koncentraciju VLDL u krvi, a u peripartalnom periodu jetra ima ograničenu sposobnost za esterifikaciju dospelih masnih kiselina u sastav VLDL i daljeg transporta u druga tkiva, pa to može biti jedan od razloga povećane incidence nastanka masne infiltracije jetre kod krava. Visoka vredost bilirubina $>9 \mu\text{mol/l}$ uz visoku aktivnost AST $>130 \text{ IU/l}$ uz nisku koncentraciju triglicerida $<0.12 \text{ mmol/l}$ i holesterola ukazuje na nastanak masne jetre kod krava.¹⁸² Postoji negativna korelacija među NEFA i holesterola, i njihova proporcija može biti upotrebljena da bi se smanjio rizik za nastanak mastitisa, metritisa i retencija placente.¹⁸³ U našim rezultatima se efekat niacina na trigliceride i holesterol može pripisati izraženom antilipolitičkom delovanju

niacina koji je doveo do pada NEFA u krvi tokom rane laktacije. Prema literaturnim podacima nije nađena značajnost efekta niacina na ukupni holesterol i trigliceride ali u ovom istraživanju, nije nađen efekat niacina na NEFA a količina koja je aplikovana je 6 grama zaštićenog niacina.¹⁸⁴ U drugom istraživanju nađen je statistički značajno niži nivo holesterola u grupi u kojoj se aplikovao niacin u odnosu na kontrolnu grupu, a niacin je bio aplikovan muškim bafalo teladima, a ne kravama u ranoj laktaciji.¹⁸⁵ Prema našim saznanjima, u literaturi nisu dostupni podaci za direktan način delovanja niacina na holesterol i trigliceride kod preživara, te su potrebna naknadna istraživanja.

Malondialdehid (MDA) je jedan od finalnih produkta peroksidacije poluzasićenih masnih kiselina u ćeliji. Povećanje slobodnih radikala prouzrokuje hiperprodukciju MDA, koji je poznat kao marker za oksidativan stres.¹⁸⁶ Koncentracija MDA je povišena u periodu posle teljenja kod mlečnih krava i pozitivno korelira sa koncentracijom NEFA i BHB.¹⁸⁷ Rezultati u ovom radu ukazuju da nedelja uzorkovanja i aplikacija niacina imaju značajan uticaj na koncentraciju MDA u krvi krava ($p < 0,0001$). Koncentracija MDA je bila značajno niža kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja (Tabela 24). Niža koncentracija NEFA i BHB kod krava koje su primile niacin je u vezi sa nižim vrednostima MDA u svim nedeljama oglada i nije utvrđen značajan porast vrednosti MDA u drugoj nedelji nakon teljenja u odnosu na prvu. U istraživanju Yuan i sar. (2012)⁴ ispitivan je nivo antioksidanta superoksid dizmutaze (SOD) kod krava u peripartalnom periodu nakon aplikacije niacina i nije utvrđen efekat niacina na koncentraciju SOD, ali se smatra da niacin može imati antioksidantni potencijal preko inhibicije lipolize i smanjenje količine masnih kiselina, substrata koji se koristi za lipidnu peroksidaciju.

Koncentracija insulina zavisi od perioda laktacije, a u krvi opada i održava se na niskom nivou u prve četiri nedelje nakon teljenja, da bi posle četvrte nedelje rasla.¹⁸⁸ Značajno je bila viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja: $4,65 \pm 0,63$; $6,17 \pm 0,83$ (teljenje, nulta nedelja); $4,42 \pm 0,6$; $5,87 \pm 0,78$ (prva nedelja) i $4,07 \pm 0,55$; $5,57 \pm 0,75$ $\mu\text{U/mL}$ (druga nedelja). Krave koje su primale niacin imale su više vrednosti insulina u svim nedeljama oglada. Nije zabeležen statistički značajan pad insulina u prvoj u odnosu na nultu nedelju, kao i u drugoj u odnosu na prvu, ali je postojala značajno niža koncentracija insulina u drugoj nedelji po teljenju u odnosu na nedelju teljenja, što važi za oglednu i kontrolnu grupu (Tabela 29). Ovi rezultati se slažu sa rezultata Titgemeyer i sar.

(2011)¹⁴³ u kome je takođe nađeno povećanje koncentracije insulina u krvi no oni su zabeležili progresivno povećanje insulina za vreme aplikacije niacina kod volova. Teško je utvrditi da li povećanje plazmatske glukoze vodi do elevacije insulina ili insulinska rezistencija vodi do povećanje glukoze. Na modelu labaratoriskih miševa pokazan je direktin štetan uticaj NEFA na B ćelije pankreasa.¹⁸⁹ Prema istraživanjima drugih autora^{185,190} nije pronađen efekat niacina na koncentraciju insulina kod goveda dok u drugom istraživanju⁶ pokazuju da se tretman niacinom kod goveda na restriktivnoj ishrani smanjuje nivo insulina u krvi bez efekta na koncetraciju glukoze.

Koncetracija glukoze u krvi preživara je niža nego kod monogastričnih životinja i glikemija kod zdravih krava varira između 2.2 do 3.3 mmol/L. Prema Šamancu i sar. (1996)¹⁹¹ nakon telenja koncetracija glukoze iznosi 2.41 mmol/l a u visokom graviditetu 2.81 mmol/L. Koncetracija glukoze je bila značajno viša kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja-Tabela 30; Grafikon 21). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori^{115,152} u kome je koncetracija glukoze u plazmi bila je povećana kod krava koje su primale nicin u odnosu na kontrolnu grupu, a Thornton i Shulz (1980)¹⁵⁶ su utvrdili pozitivnu korelaciju između koncetracija glukoze u plazmi i doze aplikovnog niacina. Ovakvo povećanje koncentracije glukoze u krvi nakon aplikacije niacina može biti u vezi sa povećanom glukoneogenetskom aktivnošću, zbog smanjenog odstranjivanja glukoze ili kao rezultat povećane hepatične produkcije glukoze.^{115,159,192} Glukoneogeneza se odvija u jetri, a povišena akumulacija triglicerida i ketone u jetri može smanjiti njenu ukupnu funkciju i samim tim sposobnost hepatocita za glukoneogenezu. Visok nivo koncetracije NEFA inhibira insulinom stimulisanu upotrebu glukoze u skeletnim mišićima i vrši supresiju glukogenolize u jetri.⁷³

U našem istraživanju merena je i vrednost indeksa glukoza:insulin (G:I) i ona pokazuje tendenciju da bude niža u grupi krava koja je primala niacin u odnosu na kontrolnu grupu, a statistički značajna razlika utvrđena je samo u nedelji teljenja. Kod ispitivanih krava postoji pozitivna korelacija glukoze i insulina (Grafikon 25), što ukazuje da povišena koncetracija glukoze posledično dovodi do povišene koncetracije insulina kod krava koju su primile niacin. Pescara i sar. (2010)¹⁵⁹ su utvrdili da insulin i glukoza imaju sličan odogovor prilikom aplikacije niacina, pa tako aplikacija niacina dovodi do porasta i glikemije i insulinemije. Sa druge strane, sa porastom koncetracije insulina u krvi opada vrednosti G:I odnosno metaboliše se manje glukoze po jedinici insulina (Grafikon 26). Ovakvo stanje nastaje jer sa porastom koncetracije

insulin opada njegova efikasnost i životnije ulaze u insulinsku rezistenciju. Krave koje primaju niacin imaju slabiju potrošnju glukoze po jedinici insulina, i to bi se mogao pripisati biološkim efektima niacin. Može se reći da je biološki efekat niacina dvojak, tako da u određenom segmentu smanjuje, a u drugom povećava stepen insulinske rezistencije, za šta su potrebna dodatna ispitivanja.

Insulinska rezistencija definisana prema Kahn-u (1978)⁵⁵ je stanje u kom „određena insulinska koncentracija prouzrokuje manji biološki odgovor nego normalan“ i može biti posledica smanjenog maksimalanog insulinskog efekta (smanjen insulinski odgovor), povećane koncentracije insulina da bi se postigao efekat (smanjena insulinska senzitivnost) ili obe. Insulinska rezistencija kod preživara u peripartalnom periodu ima funkciju davanja prioriteta glukogenih nutrienata ka fetalnom razvoju i proizvodnji mleka, a omogućava lakšu mobilizaciju lipida za energetske potrebe tkiva. U humanoj medicini je urađen veliki broj istraživanja u kojim se potvrđuje korelacije između nastale insulinske rezistencije sa povišenim nivoom NEFA u krvi.^{193,194,195} Ovakva korelacija utvrđena je i kod preživara. Model sa smanjenim unosom hrane kod krava tokom četiri dana dovodi do povećanja NEFA u plazmi i triglicerida u jetri, i redukuje odgovor insulina kod mlečnih krava koje nisu u laktaciji.⁷⁴ Pires i sar. (2007)⁷⁵ ukazuju na to da indukovana hiperlipidemija prouzrokuje insulinsku rezistencija kod Holštajn krava sa promenom u senzitivnosti i u maksimalnom odgovoru insulina, te da prekomerno povećanje koncentracije NEFA potencijalno može da poremeti funkciju adipoznog tkiva što vodi ka insulinskoj rezistenciji. Nađena je manja vrednost RQUICKI indeksa kod ugojenih krava u odnosu na krave optimalne telesne kondicije što ukazuju na veći stepen insulinske rezistencije kod gojaznijih krava.¹⁹⁶ U ovom istraživanju zabeležen je trend ka porastu vrednosti RQUICKI indeksa kod grupa krava koju su primile niacin, dok je kod kontrolne grupe postojao trend pada RQUICKI indeksa. Ovo ukazuje na povećanu insulinsku senzitivnost kod krava koje su primale niacina. Pires i sar. (2007)⁶ su pokazali da smanjena plazma koncentracija NEFA tokom delovanja niacina poboljšava odgovor insulina, ukazujući na to da je NEFA uzrok smanjene insulinske senzitivnosti. Značaj NEFA u razvoju insulinske rezistencije prikazali su Cincović i sar. (2014)⁵⁶, gde je utvrđeno da je vrednost RQUICKI indeksa najviše determinisana sa vrednostima NEFA. Cincović i sar. (2017)¹⁹⁷ su utvrdili da postoji korelacija između vrednosti RQUICKI indeksa sa velikim brojem metaboličkih parametara u ranoj laktaciji.

6.3 Uticaj aplikacije niacina na vrednost ostalih metaboličkih parametara

U ovom delu ćemo opisati parametre koji ukazuju na funkcionalni status hepatocita. Smatra se da su vrednosti bilirubina i AST senzitivni indikatori funkcije jetre tokom peripartalnog perioda.¹⁹⁸ Literaturni podaci ukazuju na to da je koncentracija bilirubina povećana kod krava u peripartalnom periodu upoređenju sa ostatkom laktacije.^{37,87,199} Ovako povećana koncentracija bilirubina može biti rezultat opterećenja hepatocita sa ketonima i redukovane ekskretorne funkcije hepatocita.^{37, 92} Rezultati naših ispitivanja pokazuju da niacin prouzrokuje značajno smanjenje koncentracije ukupnog bilirubina tokom sve tri nedelje ispitivanja, u odnosu na kontrolnu grupu. Ovako smanjena koncentracija ukupnog bilirubina može se pripisati uticaju niacina, odnosno njegovog antilipolitičkog dejstva kada se smanjena lipoliza I opterećenje jetre sa NEFA i BHB.

Alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP) i γ -glutamilttransferaze su važni katabolički enzimi, koji imaju važnu ulogu u funkciji jetre kod životinja. Aktivnosti ovih enzima u krvi mogu da budu važan indikator za funkciju jetre u peripartalnom periodu kod Holštajn krava.²⁰⁰ Određivanje aktivnosti AST i GGT kod mlečnih krava najčešće je povezana sa sindromom masne jetre, smanjenim apetitom i pojavom ketoze kod mlečnih krava.^{201,202} Povećanje AST aktivnosti u serumu je značajan marker za oštećenje jetre čak i ako je oštećenje subkliničko.²⁰³ U našim istraživanjima vrednosti AST su bile značajno niže kod krava koje su primile niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja. Vrednosti AST rastu kod ogledne i kontrolne grupe tokom nedelja nakon teljenja, maksimalna vrednost kod kontrolne grupe bila je iznad referentne granice¹⁸³ i iznosila je 105 ± 27 IU/L i to i u prvoj u drugoj nedelji, što ukazuje na pojavu hepatičnih lezija kod ovih krava, dok su sve vrednosti u oglednoj grupi bile su u okviru referentnih vrednosti. Gonzalez i sar. (2011)²⁰⁴ su utvrdili da aktivnost AST veća od 100 U/L može da bude indikator oštećenja hepatocita. Vrednost ALP i GGT isto tako su bili značajno niži kod krava koje su primile niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja (Tabela 48 i tabela 51). Ovako smanjene vrednosti aktivnosti AST, GGT i ALP u grupi koja je primila niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja ukazuje na manje hepatocelularno opterećenje i oštećenje usled manjeg dotoka NEFA i BHB u jetri. Prema našim saznanjima, u literaturi postoji vrlo malo podataka o uticaju niacina na jetrine enzime kod krava i to se odnosi na samo jednu studiju gde nije utvrđen značajan uticaj

niacina na koncentraciju AST u plazmi.²⁰⁵ Rezultati iz humane medicine pokazuju da duga upotreba niacina dovodi do oštećenja jetre sa povećanjem aktivnosti jetrinih enzima u krvi.²⁰⁶

Ukupni proteini, albumin i urea mogu biti indikatori za procenu proteinskog statusa kod krava, a indirektno govore o statusu hepatocita i inflamatornom statusu krava. U postpartalnom periodu nađena je smanjena koncentracija ukupnih proteina u krvi^{92,207} i to može da bude povezano sa smanjenim kapacitetom jetre da proizvede proteine²⁰⁰ kao i sa povišenom aktivnošću mlečne žlezde.²⁰⁸ U našim istraživanjima rezultati pokazuju da koncentracija ukupnih proteina nije značajno odstupala u grupi krava koja je primila niacin u odnosu na kontrolnu grupu, tokom sve tri nedelje ispitivanja. Iako je od nedelje teljenja do narednih dve nedelje opadala vrednost ukupnih proteina u obe grupe krava, ni jedan nalaz nije prošao granicu ispod 60 g/l koja ukazuje na povećani rizik od peripartalnih bolesti.⁹⁵ Ghorbani i sar. (2008)²⁰⁹ su zabeležili povećanje koncentracije ukupnih proteina u plazmi tokom prvih 4 nedelje postpartuma i tendenciju smanjenja do 8 nedelja postpartuma kod grupe koje su primile i koje nisu primile niacin. Naši rezultati su slični sa rezultatima Jaster i sar. (1983)¹⁹² koji nisu našli značajni efekat niacina na koncentraciju proteina u serumu kod Holštajn krava hranjene sa 12 grama niacina dnevno. Sa napretkom laktacije zabeležen je pad koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu.²¹⁰ Pad koncentracije albumina nakon partusa je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja i povezano je sa biosintetskom funkcijom jetre koja se smanjuje sa povećanim prisustvom ketonskih tela.^{200,211,212} Rezultati u našim istraživanjima pokazuju da je koncentracija albumina bila značajno viša kod krava koje su primile niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja, što ukazuje da krave koje su primile niacin imaju bolju biosintetsku funkcionalnost jetre verovatno zbog manjeg dotoka NEFA i manje produkcije ketona nego kontrolne grupe. Smanjenje koncentracije ukupnih proteina i koncentracije albumina bi se moglo povezati sa smanjenom sintezom albumina u jetri tokom inflamacije.²¹³ Neki autori navode da višak NEFA može pokazati lipotoksičnost i oksidativni stres primarno preko drugih lipidnih intermediera kao što su ceramidi, diacil glicerol i lipidni peroksidi, i mogu aktivirati inflamatorne puteve u jetri.²¹⁴ Sposobnost niacina da smanji koncentraciju NEFA u krvi može uticati na inflamatorne procese u jetri.

Prosečna koncentracija uree 5 dana pre teljenja je 4.78 ± 1.83 mmol/l, 5 dana nakon teljenja koncentracija ureje je niža i iznosi 3.90 ± 1.02 mmol/l.²¹⁵ Đoković i sar. (2009)⁹² su utvrdili značajno redukovanu koncentraciju ureje kod puerperalnih krava, a ovako redukovana sinteza

uree na početku laktacije kod mlečnih krava može biti zbog razvoja masne infiltracije i degeneracije ćelija jetre.²¹⁶ Rezultati naših istraživanja pokazuju da je koncentracija uree bila značajno niža kod krava koje su primile niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja, ali ipak koncentracija je bila u granicama referentnih vrednosti 2.0-7.5.⁹⁰ Ovakvi rezultati mogu se objasniti uticajem niacina na mikrobnu populaciju u rumenu. Primećeno je značajno povećanje populacije protozoa tokom hranjenja krava sa nezaštićenim niacinom.^{128,135,217} Povećanje protozoa ima efekat na metabolizam nitrogenu u rumenu i rezultira povećanom sintezom mikrobnih proteina.^{185,217} Favoriziranje sinteze proteina kod suplementacije sa niacinom može biti zbog toga što se fiksacija amonijaka u ruminalnoj mikroflori obavlja preko NADP ili NAD-povezane glutamil dehidrogenaze a niacin je prekursor za sintezu nukleotid piridina.²¹⁸ Ovakvo povećano iskorišćavanje amonijaka za sintezu proteina u rumenu, smanjuje količinu viška amonijaka koji treba preko ruminalnog zida da se transportuje u jetru gde se konvertuje u ureu.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da aplikacija niacina nije imala statistički značajni uticaj na koncentraciju jona kalcijuma između ogledne i kontrolne grupe krava. Iako su krave koje su primile niacina imale tendenciju više koncentracije kalcijuma u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati naših istraživanja pokazuju da je koncentracija fosfora bila značajno niža kod krava koje su primile niacin u odnosu na kontrolnu grupu tokom sve tri nedelje ispitivanja. Minimalne vrednosti fosfora u obe grupe nisu bile ispod normalne granice koncentracije fosfora, (1.3 mmol/l prema Goff, 2006²¹⁹). Kod ogledne grupe isto tako je primećena i povećana koncentracija insulina u odnosu na kontrolnu grupu a insulin smanjuje koncentracije neorganskog fosfora kao posledica ulaska glukoze u glukolitičke puteve perifernih tkiva, koja za sobom povlači i fosfor (Li i sar., 1996)²²⁰, no ovakvo smanjenje može biti povezano i sa povećanom koncentracijom NADP kod ogledne grupe.

6.4 Uticaj aplikacije niacina na povezanost metaboličkih parametara sa stepenom lipolize i ketogeneze

Mobilizacija NEFA iz adipoznog tkiva za vreme i nakon partusa kod visoko mlečnih krava je metaboličko obeležje tranzicije od graviditeta do laktacije. Difuzija NEFA u krvotok obezbeđuje energiju za tkiva u telu ali njihovo veliko povećanje može biti toksično za organizam.

Povećana koncentracija NEFA u serumu u peripartalnom periodu je jedan od indikatora da krava se nalazi u negativnom energetsom bilansu, a drugi indikator za negativan energetski bilans može biti povećana plazmatska koncentracija BHB. Drugo što je karakteristično za peripartalan period su brojne metaboličke promene kao što su smanjena glikemija, smanjena koncentracija holesterola, smanjena koncentracija uree, povećana koncentracija bilirubina, redukovana kalcemija.⁸⁷ Ove promene su rezultat negativnog energetskeg bilansa i/ili kao rezultat direktanog efekta NEFA i BHB na tkiva.²²¹

Hankes (1984)¹³² navodi da nikotinska kiselina koja izbegne metabolizam u jetri može biti transportovana u različitim tkivima u telu. Aplikovana nikotinska kiselina u mnogo većim dozama može ispuniti drugi fiziološki efekat a to je supresija lipolize.^{76, 113} U farmakološkoj dozi nikotinska kiselina inhibiše lipolizu kod goveda preko delovanja na niacinske receptore.^{6, 144} Sa aplikacijom niacina dolazi do povećanj koncentracije NAD i NADP u krvi, a preko odnosa NAD i NADP može se utvrditi status niacina u organizmu.^{170, 173, 174} U našim istraživanjima ispitana je korelacija NAD i NADP sa svim ispitanim metaboličkim parametrima. Utvrdili smo značajnu negativnu korelaciju između indikatora negativnog energetskeg bilansa NEFA i BHB i koenzima niacina NAD i NADP. Može se pretpostaviti da sa aplikacijom veće doze niacina u obliku nikotinske kiseline, dolazi do povećanje koncentracije NAD i NADP, a višak nikotinske kiseline koja se ne iskorišćava za sintezu NAD ili NADP može biti transportirana do masnog tkiva gde ostvaruje svoj efekat kao što je smanjenje intenziteta lipidne mobilizacije. Korelacija NAD i NADP sa NEFA i BHB mogu ukazati na stopu lipolize i ketogeneze, odnosno negativna korelacija između ovih parametara ukazuje da sa povećanjem koncentracije NAD i NADP u krvi smanjuje se koncentracija NEFA i BHB u krvi. Ipak naknadnim istraživanjima treba odrediti kauzalnu prirodu ovih veza.

Đoković i sar. (2014)²²² zabeležili su značajnu negativnu korelaciju nivoa NEFA i BHB sa glukozom u krvi. Veza između koncentracije glukoze i NEFA i BHB može se objasniti činjenicom da je jetra glavni organ u kojem se odvija proces glukoneogeneze kod preživara i kada ima veliku akumulaciju hepatocita sa trigliceridima i ketonima opada sposobnost hepatičnih ćelije za glukoneogenezu.⁹² Rezultati naših istraživanja pokazali su značajnu pozitivnu korelaciju između koncentracija NAD i NADP sa koncentracijama glukoze, dok je korelacija između koncentracija BHB i NEFA sa koncentracijama glukoze bila značajno negativna. Isto tako nađena je pozitivna korelacija između koncentracije NAD i NADP sa koncentracijama insulina,

ali i negativna korelacija između koncentracija BHB i NEFA sa koncentracijama insulina. Đoković i sar. (2014)²²² utvrdili su značajnu negativnu korelaciju između koncentracije insulina u serumu sa koncentracijom NEFA kod ketoznih krava, a slaže se sa tvrdnjom drugih autora da smanjenje nivoa insulina u krvi kod ketoznih krava je direktno proporcionalno sa povećanjem koncentracije NEFA u krvi.^{223,224}

Đoković i sar. (2013)¹⁹⁹ su pokazali da je koncentracija serumskih triglicerida značajno manja kod ketoznih krava u poređenju sa zdravim. Oni predpostavljaju da akumulacija triglicerida u hepatocitima kod ketoznih krava može dovesti do smanjenja cirkulatornih vrednosti ovih parametara. Đoković i sar. (2013)¹⁹⁹ nisu našli značajnu korelaciju između koncentracije triglicerida sa koncentracijama NEFA ili BHB i sugerišu da vrednosti triglicerida možda nije adekvatan indikator za lipomobilizaciju kod mlečnih krava. Međutim, isti autori u drugom ispitivanju konstatovali su značajnu negativnu korelaciju koncentracije NEFA sa koncentracijama triglicerida kod ketoznih krava.²¹² U našim istraživanjima je zabeležena negativna korelacija između koncentracija NEFA i BHB sa koncentracijama triglicerida, i pozitivna korelacija NAD i NADP sa koncentracijom triglicerida. Đoković i sar. (2012)⁸⁹ utvrdili su značajno smanjenje triglicerida, ukupnog holesterola i koncentracije albumina u serumu kod puerperalnih ketoznih krava upoređeno sa kravama, koje se nalaze u kasnom graviditetu ili kod puerperalno zdravih krava. Ovi autori su zabeležili negativnu korelaciju koncentracija NEFA ili BHB sa koncentracijom ukupnih holesterola i triglicerida. U našim istraživanjima je zabeležena značajna negativna korelacija između koncentracija NEFA i BHB sa koncentracijama holesterola, dok korelacija između koncentracija NAD i NADP sa koncentracijama holesterola bila je značajno pozitivna.

Oštećenje jetre indukuje povećanje koncentracije ukupnog bilirubina u serumu.²¹⁶ West (1990)²²⁵ je prijavio značajnu pozitivnu korelaciju između količine lipida u jetri i koncentracije ukupnog bilirubina u serumu. Đoković i sar. (2012, 2013)^{89,212} u nekoliko ispitivanja su potvrdili pozitivnu korelaciju koncentracije ukupnog bilirubina sa koncentracijom NEFA i BHB. U našim istraživanjima je zabeležena značajna pozitivna korelacija između koncentracije ukupnih bilirubina sa NEFA i BHB i značajnu negativnu korelaciju između koncentracije ukupnih bilirubina sa NAD i NADP.

Kada masti infiltriraju hepatocite, dolazi do pojave njihovih lezija i nivo enzima, koji ukazuju na hepatične povrede (AST, GGT) generalno je povećan.³⁷ Aktivnost AST u serumu

smatra se da je najsenzitivniji indikator za dijagnostiku zamašćenja jetre kod goveda.²¹⁶ Pechova i sar. (1997)²²⁶ su pokazali da je aktivnost hepatičnih enzima u krvi u korelaciji sa stopom masne infiltracije jetre. U istraživanjima Đokovića i sar. (2012)⁸⁹ utvrđena je pozitivna korelacija aktivnosti AST u krvi sa sadržajem masti u jetri, kao i sa koncentracijama slobodnih masnih kiselina i β -hidroksibuterne kiseline a u negativnoj korelaciji sa koncentracijama triglicerida, totalnih holesterola, albumina u krvnom serumu ketoznih krava. U našim istraživanjima je utvrđena značajna pozitivna korelacija koncentracija AST, ALT i GGT sa koncentracijom NEFA i BHB u serumu, a nađena je značajna negativna korelacija koncentracija ATS, ALT i GGT sa koncentracijom NAD i NADP.

Literaturni podaci ukazuju na to da u tranzicionom periodu koncentracija albumina je niža kod ketoznih krava u odnosu na zdrave krave i ovo može biti zbog redukovane sinteze albumina nakon masne infiltracije jetre.^{216, 226} U istraživanju Đoković i sar. (2012)⁸⁹ dolazi do sličnih rezultata gde je nađena manja koncentracija albumina kod ketoznih krava u odnosu na zdrave krave, a takođe je zabeležena negativna korelacija između koncentracije BHB i albumina. U drugom istraživanjanju nađena je negativna korelacija između koncentracija NEFA i albumina no rezultati nisu bili statistički značajni.²⁰⁴ U našim istraživanjima zabeležena je značajna negativna korelacija koncentracija NEFA i BHB sa koncentracijom albumina, i značajna pozitivna korelacija koncentracija NAD i NADA sa koncentracijom albumina.

Posebno je interesantno što je u našim ispitivanjima nađena značajna negativna korelacija vrednosti NAD i NADP sa vrednostima uree i pored toga što su drugi indikatori kao što su glukoza, trigliceridi, holesterol, albumin koju ukazuju na funkciju hepara bili u pozitivnoj korelaciji sa NAD i NADP. Ovo može ukazati na to da nakon aplikacije niacina dolazi do smanjene koncentracije uree u krvi zbog povećanog iskorišćenja uree i povećane produkcije proteina u buragu a da nije u vezi sa funkcionalnim statusom jetre. Neki autori zabeležili su negativnu korelaciju koncentracije NEFA sa koncentracijom uree dok je u našim istraživanjima nađena pozitivna korelacija koncentracija NEFA sa koncentracijom uree.^{199, 204}

6.5 Uticaj aplikacije niacina na proizvodnju mleka kod krava u ranoj laktaciji

U našim istraživanjima aplikacija niacina nije imala statistički značajni efekat na proizvodnju mleka. Međutim, u prvih 30 dana laktacije, krave kod kojih je bio apliciran niacin pokazali su tendenciju povećane proizvodnje mleka, ali se ova tendencija gubi ako se posmatra

širi period od 60 dana laktacije postpartum. Prema literaturnim podacima dobijeni su različiti rezultati u odnosu proizvodnju mleka nakon aplikacije niacina. Martinez i sar. (1991)¹⁶², Erikson i sar. (1992)¹⁵³, Bernard i sar. (1995)²²⁷, Yuan i sar. (2011)⁴ utvrdili su da proizvodnja mleka nije bila izmenjena nakon aplikacije niacina. Razlog za nedostatak efekta niacina na produkciju mleka može biti period laktacije kad je bio apliciran niacin i da krave nisu u negativanom energetske bilansu²²⁸, jer us recimo Yuan i sar. (2011)⁴ aplikovali niacin bio je 63±29 dana nakon partusa. Pod uslovima toplotnog stresa Di Constanzo i sar. (1997)¹¹⁵ su utvrdili su da suplement nezaštićenog niacina (12, 24 ili 36 g/krava dnevo) nije uticao na proizvodnju mleka ili sastav mleka kod muznih krava. U drugoj studiji utvrđeno je povećanje produkcije mleka nakon aplikacije niacina.^{163,164} Dufva i sar. (1983)¹⁵¹ su zabeležili konstantno povišenu produkciju mleka kod krava koje su primale niacin u odnosu na kontrolnu grupu krava no razlike nisu bile statistički značajne u 3 i 4 nedelju postpartum. Fronk i Schultz (1979)²²⁹ ustanovili su da se produkcija mleka značajno povećava kada su ketozne krave bile tretirane sa 12 grama niacin dnevno. Muller i sar. (1986)²³⁰ prijavili su da je davanje kravama 6 g na dan nezaštićenog niacina dovelo do povećanja prosečne produkcije mleka za 1 kg na dan, dok su Shwab i sar. (2005)¹²⁷ svojoj meta analizi utvrdili da davanje niacina 12 g/dan povećava proizvodnju mleka za 0.4 kg/dan, a prinosi masti i proteina u mleku bili su 25.8g/dan i 17.4 g/dan viši.

Razlozi za ovakav nekonstantan odgovor laktacije na niacin nisu sasvim jasni. Yuan i sar. (2011)⁴ i Karkoodi i Tamizrad (2009)¹⁵² navode da je davanje niacina najefikasniji kada se krava nalazi u ranoj laktaciji i u negativnom energetske bilansu. Drugi autori navode da povećanje mikrobne produkcije proteina nakon aplikacija niacina može biti jedan od razloga za poboljšanu produkciju mleka, a drugi razlog može biti efekat niacina na lipidni i energetske metabolizam.¹⁹² U našim istraživanjima izračunato je da 60% krava koje su primile niacin pokazali su statistički značajno veću proizvodnju mleka u odnosu na kontrolnu grupu u prvih 30. dana laktacije. Poznato je da negativni energetske bilans kod najvećeg broja krava je najizraženije oko 14. dana laktacije i koncentracija NEFA u krvi dostiže maksimum za vreme teljenja ili u prvoj nedelju laktacije i zbog toga efekat niacina na produkciju mleka je najizraženiji tada (u našem ogledu mlečnost je merena 30. dana laktacije), da bi sa napredovanjem laktacije (60. dana) procenat krava kod kojih je postojala značajno veća proizvodnja mleka u odnosu na negativnu kontrolu opao na 26.6% (Grafikon 54). Dodatnim analizama treba utvrditi da li postoji razlika u odgovoru

krava na niacin u funkciji porasta proizvodnje mleka te utvrditi isplativost upotrebe niacina u različitim periodima laktacije u odnosu na efekat koji se postiže na mlečnost.

6.6 Uticaj statusa niacina na morfometrijska svojstva hepatocita i adipocita

Kod mlečnih krava adipozno tkivo igra važnu ulogu kao izvor energije za održavanje laktacije, ali prevelika mobilizacija masnog tkiva za vreme negativnog energetskog bilansa u ranoj laktaciju može prouzrokovati zamašćenje jetre i ketozu, koji mogu imati uticaj na produkciju mleka u ranoj laktaciji.³³ Negativni energetski bilans, smanjenje unosa hrane, stres, hormonalni disbalans i partus su važni faktori rizika za hepatičnu lipidozu kod mlečnih krava. Hepatična lipidoza povećava rizik za nastanak peripartalnih oboljenja, posebno za peripartalnu ketozu.^{32,131} Kod ljudi i glodara, jetra je glavni organ za *de novo* sintezu masnih kiselina iz glukoze¹³², dok je kod preživara adipozno tkivo glavno mesto lipogenetske aktivnosti.¹³³ Kod ovih životinja acetat je primarni substrat za *de novo* sintezu masnih kiselina u adipoznom tkivu. *De novo* sinteza masnih kiselina zahteva adekvatno snabdevanje citosola sa NADPH, a za ovakvu sintezu jednog molekula palmitinske kiseline potrebno je četrnaest molekula acetil CoA i NADPH. Smatra se da su aktivnosti u pentozofosfatnom ciklusu glavni izvori NADPH za lipogenezu. Baldwin i sar. (1976)¹³⁴ nalaze da je kod laktacionih krava 64% NADPH potrebnih za lipogenezu u adipoznom tkivu generirano iz pentozofosfatnog ciklusa. U procesu lipogeneze NADPH je agens koji vrši redukciju, odnosno donira elektron i dobija se NADP⁺. Drugi važni metabolički put u kome učestvuje NAD je β -oksidacija masnih kiselina u mitohondrijama jetre.¹³⁵ U našem drugom ogledu ispitivana je međusobna povezanost morfometrijskih parametra hepatocita, adipocita i koenzima niacina kod krava isključenih iz proizvodnje tokom rane laktacije, tako što je određena vrednost NAD i NADPH u krvi kao i količnik NAD/NADP i statistički je ispitana njihova povezanost sa morfometrijskih parametrima adipocita i hepatocita. Nađena je pozitivna korelacija između vrednosti NAD i dijametar adipocita, što može ukazati na bolju lipogenezu kod onih životinja sa višim koncentracijama NAD i NADPH. Istraživanja su pokazala da krave sa boljim statusom niacina (veća vrednost NAD i NADP) imaju manji dijametar masnih vakuola u hepatocitima, manju optičku gustinu ovih vakuola, uz povećan diajmetar jedra hepatocita i njegovu optičku gustinu, što može biti povezano sa učešćem NAD-a u β -oksidaciji masnih kiselina u jetri ili sa smanjenom lipolizom u adipoznom tkivu kao rezultat

antilipolitičke aktivnosti niacina. U našim istraživanjima primećeno je da sa povećanjem dimenzije adipocita opadaju dimenzije masnih vakuola u hepatocitima, a krave sa boljim statusom niacina (viša vrednost NAD i NADP) pokazuju manji stepen zamašćenja i bolju vitalnost hepatocita što bi se moglo povezati sa sposobnošću niacina da suprimira lipolizu i time zaštiti krave od metaboličkih bolesti.

7.ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- 1) NAD i NADP predstavljaju adekvatne pokazatelje statusa niacina kod krava u ranoj laktaciji, a njihova vrednost je značajno viša kod krava koje su primale ovaj vitamin. NED i NADP pokazuju pozitivnu korelaciju. Pored ovoga izvedene vrednosti kao što je NAD:NADP indeks i površina ispod krive koju prave ovi vitameri posle teljenja zavise od aplikacije niacina.
- 2) Aplikacija niacina dovodi do smanjenja koncentracije NEFA, BHB i MDA, a do povećanja koncentracije triglicerida i holesterola u krvi krava.
- 3) Aplikacija niacina dovodi do porasta koncentracije insulina i glukoze kod krava posle teljenja.
- 4) Uticaj niacina na insulinsku rezistenciju se mora dvojako posmatrati. Krave koje primaju niacin imaju nižu vrednost indeksa glukoza:insulin, što znači da se po jedinici insulina neutrališe manje glukoze. Ovakvo stanje nastaje jer sa porastom koncentracije insulina opada njegova efikasnost i životinje ulaze u insulinsku rezustenciju. Međutim, RQUICKIBHB indeks insulinske rezistencije je pokazao da su krave koje su primale niacin mnogo osetljivije na insulin, što se može pripisati povećanoj insulinskoj senzitivnosti masnog tkiva.
- 5) Kod krava koje su primale niacin nađena je niža koncentracija bilirubina i aktivnost AST, ALP i GGT. Nađena je viša koncentracija albumina i viša koncentracija uree i niža koncentracija fosfora. Rezultati pokazuju da aplikacija niacina pozitivno utiče na status hepatocita, a može uticati i na metabolizam proteina u organizmu zbog promena u vrednosti uree.
- 6) Promena metaboličkih parametara posle teljenja išla je u istom pravcu u ogleđnoj i kontrolnog grupu, samo se menjao intenzitet promena u funkciji aplikacije niacina.
- 7) Parcijalna korelacija pokazuje da vitameri niacina mogu objasniti određeni deo korelacije koji postoji između lipolize, ketogeneze i metaboličkim parametrima. Stopa promene veze između metaboličkih parametara sa NEFA i BHB zavisi od stope promene statusa niacina

u organizmu krava u ranoj laktaciji. Naknadnim istraživanjima treba odrediti kauzalnu prirodu ovih veza.

- 8) Krave koje su primale niacin pokazivale su tendenciju povećane proizvodnje mleka do 30. dana laktacije. Ovakav uticaj niacina se izgubio prilikom merenja u 60. danu laktacije.
- 9) Krave sa boljim statusom niacina (viša vrednost NAD i NADP) pokazuju manji stepen zamašćenja i bolju vitalnost hepatocita, a nađen je i veći dijametar adipocita u potkožnom masnom tkivu, što se može pripisati antilipoliznom efektu niacina.

8.LITERATURA

1. Grummer R.R.: Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76(12):3882-96, 1993.
2. Zhao F.Q., Keating A.F.: Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 90:76-86, 2007.
3. Carloson L.A.:Nicotinic acid: The broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review *J. Intern. Med.* 258:94-114, 2005.
4. Yuan K., Shaver R.D., Bertics S.J., Espineira M., Grummer R.R.: Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress, and performance of transition dairy cows. *J.Dairy Sci.* 95:2673-2679, 2012.
5. Morey S.D., Mamedova L.K., Anderson D.E., Armendariz C.K., Titgemeyer E.C., Bradford B.J.: Effects of encapsulated niacin on metabolism and production of periparturient dairy cows *J. Dairy Sci.* 94:5090-5104, 2011.
6. Pires J. A. A., Pescara J. B., Grummer R. R.: 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.
7. Bauman D.E., Currie W.B.: Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63:1514-1529,1980.
8. Bell A. W.: Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73(9):2804-2819, 1995.
9. NRC National Research Council. *Nutrient Requirements of DairyCattle.* 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC, 2001.
10. Doepel L., Lapierre H., Kennelly J.J.: Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J Dairy Sci.* 85:2315–2334, 2002.
11. Butler S.T., Marr A.L., Pelton S.H., Radcliff R.P., Lucy M.C., Butler W.R.: Insulin restores GH responsiveness during lactation induced NEBAL in dairy cattle: Effects on expression of IGF-1 and GH receptor-1a. *Journal of Endocrinology.* 176: 205-217,2003.
12. Grummer R.R. Carroll D.J.: Effect of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 69: 3838-3852, 1991.
13. Tamminga S.,Luteijn P.A., Meijer G.M.:Changes in composition and anergy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livest. Prod. Sci.* 52:31-38, 1997.
14. Mulligan F.J., Doherty M.L.: Production diseases of the transition cow. *Vet. J.* 176:3-9, 2008.
15. Dyk P. B., Emery R. S., Liesman J. L., Bucholtz H. F., VandeHaar. M. J: Prepartum non-esterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems. *J. Dairy Sci.* 78:264, 1995.

16. Kronfeld D.S.: Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy-cows. *J. Dairy Sci.* 65: 2204-2212, 1982.
17. Graber, M., Kohler S., Kaufmann T., Doherr M. G., Bruckmaier R. M., Van Dorland H. A.: A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *J. Dairy Sci.* 93:5200–5215, 2010.
18. Renaville R., Hammadi M., Portetelle D.: Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:351-360, 2002
19. Drackley J.K.: Lipid metabolism. In: D'Mello JPF (Ed) *Farm animal metabolism and nutrition.* CAB International, New York, pp. 97–119, 2000.
20. Ingvarstsen K.L, Andersen J.B.: Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci.* 83(7):1573-97, 2000.
21. Ricci R., Bevilacqua F.: The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. *Vet. J.* 191:292-298, 2012.
22. Bines, J. A., Hart I.C.: Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. *J. Dairy Sci.* 65: 1375-1389, 1982.
23. Veerkamp, R.F., Emmans G.C.: Sources of genetic variation in energetic efficiency of dairy cows. *Livestock Prod. Sci.* 44: 87-97, 1995.
24. Lampidonis A.D., Rogdakis E., Voutsinas G.E., Stravopodis D.J.: The resurgence of hormone-sensitive lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene.* 477:1–11, 2011.
25. Holm C.: Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* 31(Pt 6):1120–1124, 2003.
26. McNamara J.P.: Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. *J. Dairy Sci.* 74:706–719, 1991.
27. De Koster J.D., Opsomer G. :Insulin resistance in dairy cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29:299–322, 2013.
28. Kushibiki S., Hodate K., Shingu H., Obara Y., Touno E., Shinoda M., Yokomizo Y.: Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor- α treatment in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 86:819–827, 2003.
29. Londos C., Brasaemle D. L., Schultz C. J., Adler-Wailes D. C.: Levin D. M, Kimmel A. R., Rondinone C.M.: On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892:155–168, 1999.
30. Pires J.A.A, Delavaud C., Faulconnier Y., Pomiès D., Chilliard Y.: Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 96:6423-6439, 2013.
31. Dann H.M., Douglas G.N., Overton T.R., Drackley J.K.: Carnitine palmitoyltransferase activity in liver of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 251, 2000.
32. Oikawa S., Mizunuma Y., Iwasaki Y., Tharwat M.: Changes of very low-density lipoprotein concentration in hepatic blood from cows with fasting-induced hepatic lipodosis. *Can. J. Vet. Res.* 74(4): 317–320, 2010.

33. Drackley J.K.: Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82:2259–2273, 1999.
34. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Janovick Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P. et al. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4: 323-44, 2005.
35. Stipanuk M. H.: *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition.* W. B. Saunders, Pennsylvania, PA, 2000.
36. Drackley J. K., Overton T. R., Douglas G. N.: Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 84:E100-E112, 2001.
37. Bobe G., Young J.W., Beitz D.S.: Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87:3105-3124, 2004.
38. 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.
39. Vernon R.G.: Adipose tissue: An expanding role in the regulation of energy metabolism. In: *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism.* W. B. Souffrant and C. C. Metges, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, p.451–464, 2003.
40. Chagas L. M., Lucy M. C., Back P. J., Blanche D., Lee P J. M., Gore J. S., Sheahan A. J., Roche J. R.: Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrates in early lactation. *J. Dairy Sci.* 92:216-222, 2009.
41. Andrew S. M., Waldo D. R., Erdman R. A.: Direct analysis of body composition of dairy cows at three physiological stages. *J. Dairy Sci.* 77:3022–3033, 1994.
42. Šamanc H., Kirovski., Jovanović M., Vujanac I., Bojković-Kovačević S., Jakić-Dimić D., Prodanović R., Stajković S.: New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows. *Acta Veterinaria (Beograd).* 60: 525-540, 2010.
43. Šamanc H., Gvozduć D., Fratrć N., Kirovski D., Djoković R., Sladojević Ž., Cincović M.: Body condition score loss, hepatic lipidosis and selected blood metabolites in Holstein cows during transition period *Animal Science papers and Reports.* 33 (1),35-47, 2015.
44. Garnsworthy P.C. Body condition score in dairy cows: Targets for production and fertility. In: *Recent Advances in Animal Nutrition* P.C. ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 61–86, 2007.
45. Busato A., Faissler D., Kupfer U., Blum J.W.: Body condition scores in dairy cows: Associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.,* A49: 455-460, 2002.

46. Gillund P., Reksen o., Grohn YT. Karlberg K.: Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84(6):1390-1396, 2001.
47. Đoković R.D.: Endokrini status mlečnih krava u peripartalnom periodu. Agronomski fakultet, Čačak, 2010.
48. McGuire, M. A., Grinari J. M., Dwyer D.A., Bauman D.E.: Role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *J. Dairy Sci.* 78:816-824,1995.
49. Lucy M.C., Verkerk G.A., Whyte B.E.: Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J. Dairy Sci.* 92:526-539, 2009.
50. Knapp J.R., Freetly H.O., Reis B.L., Calvert C.O., Baldwin R.: Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75(4): 1025-1035, 1992.
51. Hammon H. M., Stürmer G., Schneider F., Tuchscherer A., Blum H., Engelhard T., Genzel A., Staufenbiel R., Kanitz W.: Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving. *J. Dairy Sci.* 92:1554-1566, 2009.
52. She P., Lindberg G. L., Hippen A. R., Beitz D. C., Young J. W.: Regulation of messenger ribonucleic acid expression for gluconeogenic enzymes during glucagon infusions into lactating cows. *J. Dairy Sci.* 82:1153-1163,1999.
53. Duncan R.E., Ahmadian M., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Sook Suk H: Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 27:79-101.2007.
54. McNamara J.P.,McFarland D.C.,I Bai S.: Regulation of Bovine Adipose Tissue Metabolism During Lactation. 3. Adaptations of Hormone-Sensitive and Lipoprotein Lipases. *J. Dairy Sci.* 70 (7):1377–1384, 1987.
55. Kahn C.R.: Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism.* 12(2):1893-1902, 1978.
56. Cincović M. R., Belič B., Đoković R., Toholj B., Hristovska T., Delič B., Došenović M.: Insulin resistance in cows during dry period and early lactation. *Contemporary agriculture.* 3(1-2): 98-105, 2014.
57. Holstenius P.: Hormonal regulation related to the development of fatty liver and ketosis. *Acta Vet. Scand.* 89(S):55-60, 1993.
58. Boura-Halfon S., Zick Y.: Phosphorylation of IRS proteins,insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol.Metab.* 296:E581–E591, 2009.
59. Abe H., Morimatsu M., Nikami H., Miyashige T., Saito M.: Molecular cloning and mRNA expression of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). *J. Anim. Sci.* 75:182-188,1997.
60. Zhao F.Q., Okine E.K., Cheeseman C.I., Shirazi-Beechey S.P., Kennelly J.J.: Glucose transporter gene expression in lactating bovine gastrointestinal tract. *J. Anim. Sci.* 76: 2921-2929, 1998.

61. Liao S.F., Harmon D.L., Vanzant .S., Mcleod K.R., Boling J.A., Matthews J.C.: The small intestinal epithelia of beef steers differentially express sugar transporter messenger ribonucleic acid in response to abomasal versus ruminal infusion of starch hydrolysate. *J. Anim. Sci.* 88:306-314, 2010.
62. Nishimoto H., Matsutani R., Yamamoto S., Takahashi T., Hayashi K.G., Miyamoto A., Hamano S., Tetsuka M.: Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *Journal of Endocrinology.* 188:111-119, 2006.
63. Zhao F.Q., Miller P.J., Wall E.H., Zheng Y.C., Neville M.C.,McFadden T.B.: Bovine glucose transporter GLUT8: cloning, expression,and developmental regulation in mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta.*1680:103-13, 2004.
64. Kokkonen T., Taponen J., Anttila T., Syrjälä-Qvist L., Delavaud C., Chilliard Y., Tuori M.,Tesfa A.T.: 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.
65. Drackley J.K.: Lipid metabolism. In: D'Mello JPF (Ed) *Farm animal metabolism and nutrition.* CAB International, New York, pp. 97–119, 2000.
66. Yang Z., Huang K.H., Hou J.F., Mao X.Z., Yu Z.H.: Study on Lipid mobilization in dairy cows with ketosis and after parturition. *J Nanjing Agric Univ.*16:134–138, 1993
67. Yki-Järvinen H.:Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. *J. R. Soc. Med.* 95(42):39–45, 2002.
68. Langin D., Dicker A., Tavernier G., Hoffstedt J., Mairal A., Rydén M., Arner E., Sicard A., Jenkins C.M., Viguerie N., :Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes.* 54:3190–3197, 2005.
69. Bachmann O.P., Dahl D.B., Brechtel K., Machann J., Haap M., Maier T., Loviscach M., Stumvoll M., Claussen C.D., Schick F., Häring H.U., Jacob S.: Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* 50:2579–2584, 2001.
70. Petersen F. K., Shulman G.I.: New insights into the pathogenesis of insulin resistance in humans using magnetic resonance spectroscopy. *Obesity.* 14:34–40, 2006.
71. Shulman, G.I.: Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*106:171–176, 2000.
72. Boden G. :Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18:139–143, 2011.
73. Hayrli 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.
74. Oikawa S., Oetzel R.:Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J. Dairy Sci.* 89:2999–3005,2006.
75. Pires J. A. A., Souza A. H., Grummer R. R.: Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90:2735–2744, 2007.

76. Pires J.A.A., Grummer R.R.: 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.
77. Li P., Li X.B., Fu S.X., Wu C.C., Wang X.X., Yu G.J., Long M., Wang Z., Liu G.W.: Alterations of fatty acid β -oxidation capability in the liver of ketotic cows. *J. Dairy Sci.* 95:1759-1766, 2012.
78. Mashek D.G., Grummer R.R.: Effects of long chain fatty acids on lipid and glucose metabolism in monolayer cultures of bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 86:2390–2396, 2003.
79. Cadorniga-Valino C., Grummer R.R., Armentano L.E., Donkin S.S., Bertics S.J.: Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 80:646–656, 1997.
80. Đokovic R.D, Cincovic M.R., Belic B.M, Toholj B., Davidov I., Hristovska T.: Relationship between blood metabolic hormones, metabolites and energy balance in simmental dairy cows during peripartum period and lactation. *Pakistan Veterinary Journal.* 35(2):163-167, 2015.
81. Louet J.F., Le May C., Pegorier J.P., Decaux J.F., Girard J.: Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem. Soc. Trans.* 29:310–316, 2001.
82. Li P., Liu Y., Zhang Y., Long M., Guo Y, Wang Z., Li X., Zhang C., Li X., He J, Liu G.: Effect of Non-Esterified Fatty Acids on Fatty Acid Metabolism-Related Genes in Calf Hepatocytes Cultured in Vitro. *Cell Physiol Biochem.* 32:1509-1516, 2013.
83. Duffield T.F., Lissemore KD., McBride B.W., Leslie K.E.: Impact of hyperketonemia in early lactation and under defense: a review. *Vet Res.* 31:397-412, 2009.
84. LeBlanc S.J., Leslie K.E., Duffield T.F.: Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 88:159-170, 2005.
85. Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E.N., Schukken Y.H. Hyperketonemia and udder defense: a review *Vet. Res.* 31:397-412, 2000.
86. Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd H., Eddy R.G.: *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle.* Second edition. USA: Blackwell Publishing Company. 2004.
87. 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.
88. Cincović M.R., Belić B., Radojičić B., Hristov S., Đoković R.Č.: Influence of lipolysis and ketogenesis to metabolic and hematological parameters in dairy cows during periparturient period. *Acta Vet.* 62: 429-444, 2012.
89. 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 inAnimal Husbandry.* 28 (4):705-714, 2012.

90. Radostits O.M., Blood D.C., Gay C.C., Hinchcliff K.W.: *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 9th ed W.B.Saunders Company Ltd London, New York, Philadelphia, San Francisco, St. Louis, Sydney, 2000.
91. Allen M.S., Bradford B.J., Oba M.: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminantes. *J. Anim. Sci.* 87:3317-3334, 2009.
92. Đoković R.D., Ilić Z., Bogosavljević-Bošković S., Petrović M.: The functional state of liver cells in dairy cows in postpartal period and during lactation. *Contemporary agriculture*. 58(3-4):37-43, 2009.
93. Jovanović M.J., Stamatović S., Šamanc H.: Prilog proučavanju metaboličkog profila krava u laktaciji. *Vet. Glasnik*. 41(6): 449-454, 1987.
94. Alberghina D., Giannetto C., Vazzana I., Ferrantelli V., Piccione G.: Reference Intervals for Total Protein Concentration, Serum Protein Fractions, and Albumin/Globulin Ratios in Clinically Healthy Dairy Cows. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23:111-114, 2011.
95. Van Saun R.J.: Metabolic Profiling and Health Risk in Transition Cows, pp. 212-213, In: *Proceedings 37th Annual American Association of Bovine Practitioners Convention*. Ft. Worth, Texas, 2004.
96. Otto F., Bagasse P., Bogin E., Harun M. and Vilela F. Biochemical blood profile of Angonicattle in Mozambique. *Israel J. Vet. Med.* 55: 1-9, 2000.
97. Hausman G. J., Dodson M. V., Ajuwon K., Azain M., Barnes K. M., Guan L. L., Jiang Z., Poulos S. P., Sainz R. D., Smith S., Spurlock M., Novakofski J., Fernyhough M. E., Bergen W. G.: Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J. Anim. Sci.* 87:1218-1246, 2009.
98. Waltner S.S., McNamara J.P., Hillers J.K., Brown D.L.: Validation of indirect measures of body fat in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 77: 2570–2579, 1994.
99. Eguinoa P., Brocklehurst S., Arana A., Mendizabal J. A, Vernon R. G., Purroy A.: Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *J. Anim. Sci.* 81:432-440, 2003.
100. Mendizabal J. A., Alberti P., Eguinoa P., Arana A., Soret B., Purroy A.: Adipocyte size and lipogenic enzyme activities in different adipose tissue in steers of local Spanish breeds. *Anim. Sci.* 69:115–121, 1999.
101. Palou M., Priego T., Sánchez J., Rodríguez A. M., Palou A., C. Picó C.: Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologic features. *Cell. Physiol. Biochem.* 24:547-556, 2009.
102. Locher L.F, Meyer N., Weber E-M, Rehage J., Meyer U., Dänicke .: Hormone-sensitive lipase protein expression and extent of phosphorylation in subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues in the periparturient dairy cow. *J Dairy Sci.* 94:4514–4523, 2011.

103. Von Soosten D., Meyer U., Weber E.M., Rehage J., Flachowsky G., Dänicke S.: Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on performance, adipose depot weights, and liver weight in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2859–2870, 2011.
104. Akter S.H., Häussler S., Dänicke S., Müller U., von Soosten D., Rehage J.: Physiological and conjugated linoleic acid-induced changes of adipocyte size in different fat depots of dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 94:2871–2882, 2011.
105. Hood R.L., Thompson E. H., Allen C.E.: The role of acetate, propionate, and glucose as substrates for lipogenesis in bovine tissues. *Int. J. Biochem.* 3:598-606,1972.
106. McNamara J.P.: Role and regulation of adipose tissue metabolism during lactation. *J. Nutr. Biochem.* 6:120-129, 1995.
107. Vernon R.G., Doris R., Finley E., Houslay M.D., Kilgour E., Lindsay-Watt S.: Effects of lactation on the signal transduction systems regulating lipolysis in sheep subcutaneous and omental adipose tissue. *Biochem. J.* 308:291-296, 1995.
108. Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J., Beaver D.E.: Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:1201-1217, 2003.
109. Reid I.M., Collins R.A.: The pathology of post-parturient fatty liver in high-yielding dairy cows. *Invest. Cell Pathol.* 3:237–249, 1980.
110. Bender D.A.: Niacin. In: *Nutritional biochemistry of the vitamins.* 2ed ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
111. O'Neil M.J.: *The Merck Index- An Encyclopedia of Chemicals ,Drugs and Biological.* Whitehouse Station, NJ:Merck and Co., Inc.,p.1129, 2006.
112. 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.
113. 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.
114. Henderson L.M.: Niacin. *Annu Rev Nutr.* 3:289-307, 1983.
115. Di Costanzo A., Spain J.N., Spiers D.: Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. *J. Dairy Sci.* 80:1200–1206, 1997.
116. Zimbelman R.B., Baumgard L.H., Collier R.J.: Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 93:2387–2394, 2010.
117. Griinari J.M., McGuird M.A., Dwyer D.A., Baumman D.E., Palmquist D.L.: Role of insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cow. *J.Dairy Sci.* 80:1076-1084,1997.
118. DiPalma J.R., Thayer W.S.: Use of niacin as a drug. *Annu. Rev. Nutr.* 11:169, 1991.

119. Santschi D.E., Chiquette J., Berthiaume R., Martineau R., Matte J.J., Mustafa A.F., Giard C.I.: 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.
120. Santschi D.E., Berthiaume R., Matte J.J., Mustafa A.F., Girard C.L.: Fate of supplementary B-vitamins in gastrointestinal tract of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 2043-2054, 2005.
121. Porter J.W.G.: Vitamin synthesis in the rumen. In: Digestive physiology and nutrition of the ruminant. D. Lewis, Butterworths, London, 1961.
122. Schwab E.C., Schwab C.G., Shaver R.D., Girard C.L., Putnam D.E., Whitehouse N.L.: Dietary Forage and Nonfiber Carbohydrate Contents Influence B-Vitamin Intake, Duodenal Flow, and Apparent Ruminal Synthesis in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89:174-187, 2006.
123. Campbell J.M., Murphy M.R., Christensen R.A., Overton R.R.: Kinetics of niacin supplements in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 77:566-575, 1994.
124. Erikson P.S., Murphy M.R., McSweeney C.S., Trusk A.M.: Niacin absorption from the rumen. *J. Dairy Sci.* 74:1078, 1991.
125. Harmeyer J., Kollenkirchen U.: Thiamin and niacin in ruminant nutrition. *Nutr. Res. Rev.* 2:201, 1989.
126. Zinn R.A., Owens F.N., Stuart R.L., Dunbar J.R., Norman B.B.: B-vitamin supplementation of diets for feedlot calves. *J. Anim. Sci.* 65(1):267-77, 1987.
127. Schwab E.C., Caraviello D.Z., Shaver R.D.: A meta-analysis of lactation responses to supplemental dietary niacin in dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 21:239-247, 2005.
128. Niehoff I.D., 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.
129. 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.
130. Nabokina S.M., Kashyap M.L., Said H.M.: Mechanism and regulation of human intestinal niacin uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289:97-103, 2005.
131. 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.
132. Hanks L.V.: Nicotinic acid and nicotinamide. In *Handbook of Vitamins, Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects.* L.J Machined, ed. New York: Marcel Dekker. p.329-377, 1984.
133. 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.
134. Riddell D.O., Bartley E.E., Dayton A.D.: Effect of nicotinic acid on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Dairy Sci.* 63(9):1429-1436, 1980.

135. 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.
136. Kumar R., Dass R.S.: Effect of niacin supplementation on rumen metabolites in Murrah Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Asian-Australas J Anim Sci.*, 18(1):38-41, 2005.
137. Madison-Anderson R.J., Schingoethe D.J., Brouk M.J., Baer R.J., Lentsch M.R.: Response of lactating cows to supplemental unsaturated fat and niacin. *J. Dairy Sci.* 80(7):1329-1338, 1997.
138. Arambel M.J., Bartley E.E., Dennis S.M., Riddell D.O., Camac J.L., Higginbotham J.F., Simons G.G., Dayton A.D.: Effect of toasted soybean meal with or without niacin on rumen fermentation, passage rate of duodenal digesta and digestibility of nutrients. *Nutr. Rep. Int.* 34(6):1011-1020, 1986.
139. Riddell D.O., Bartley E.E., Dayton A.D.: Effect of nicotinic acid on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Dairy Sci.* 63(9):1429-1436, 1980.
140. Niehoff I.D., Huther L., Lebzien P.: Niacin for cattle: A review. *Br. J. Nutr.* 101:5-19, 2009.
141. Carlson L.A. Studies on the effect of nicotinic acid on catecholamine stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro. *Acta Med. Scand.* 173:719-722, 1963.
142. Wise A., Foord S.M., Fraser N.J., Barnes A.A., Elshourbagy N., Eilert M., Ignar D.M., Murdock P.R., Stepkowski K., Green A., Brown A.J., Dowell S.J., Szekeres P.G., Hassall D.G., Marshall F.H., Wilson S., Pike N.B.: Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 278:9869-9874, 2003.
143. 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.
144. Gille A., Bodor E.T., Ahmed K., Offermanns S.: Nicotinic acid: Pharmacological effects and mechanisms of action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:79-106, 2008.
145. Offermanns S.: The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends. Pharmacol. Sci.* 27 (7):384-390, 2006.
146. 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.
147. 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, 2011.
148. Taggart A. K., Kero J., Gan X., Cai T. Q., 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 S. D., Waters M. G.: d - β -Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J. Biol. Chem.* 280:26649-26652, 2005.

149. Overton T.R., Waldron M.R.: Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J. Dairy Sci.* 87:105-119, 2004.
150. Weiss W.P., Gonzalo F.: Are your cows getting the vitamin they need? *J. WCDS advances in Dairy Technology.* 18:249-259, 2006.
151. Dufva G.S., Bartley E.E., Dayton A.D., Riddell D.O.: Effect of niacin supplementation on milk production and ketosis of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 66:2329–2336, 1983.
152. Karkoodi K., Tamizrad K.: Effect of niacin supplementation on performance and blood parameters of Holstein cows. *South African Journal of Animal Science.* 39(4), 2009.
153. Erickson P.S., Murphy M., Clark J.H.: Supplementation of dairy cow diets with calcium salts of long-chain fatty acids and nicotinic acid in early lactation. *J. Dairy Sci.* 75:1078, 1992.
154. Al-Abbasy E.G.H.: Effect of Adding Two Levels of Niacin in Milk Production and Controlling Indicators of Ketosis in Friesian Cows Postpartum. *Br. J. Dairy Sci.* 3(1):1-4, 2013.
155. Belibasakis N.G., Tsirgogianni D.: Effects of niacin on milk yield, milk composition, and blood components of dairy cows in hot weather. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:53–59, 1996.
156. Thornton J.H., Schultz L.H.: Effects of administration of nicotinic acid on glucose, insulin, and glucose tolerance in ruminants. *J. Dairy Sci.* 63:262–268, 1980.
157. Santomauro A.T., Boden G., Silva M.E., Rocha D.M., Santos R.F., Ursich M.J., Strassmann P.G., Wajchenberg B.L.: Overnight lowering of free fatty acids with acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes.* 48:1836–1841, 1999.
158. Bajaj M., Suraamornkul S., Romanelli A., Cline G.W., Mandarino L.J., Shulman G.I., DeFronzo R.A.: Effect of a sustained reduction in plasma free fatty acid concentration on intramuscular long-chain fatty Acyl-CoAs and insulin action in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 54(11):3148-53, 2005.
159. Pescara J.B., Pires A.A., Grummer R.R.: Antilipolytic and lipolytic effects of administering free or ruminally protected nicotinic acid to feed-restricted Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:5385-5396, 2010.
160. Nilson K.M., Owen F.G., Georgi C.E.: Effect of abrupt ration change on rumen microorganisms and the niacin and vitamin B content of rumen fluid and milk. *J. Dairy Sci.* 50:1172–1176, 1967.
161. Wagner K., Mockel P., Lebzien P., Flachowsky G.: Influence of duodenal infusion of nicotinic acid on the milkfat composition of dairy cows. *Arch Anim Nutr.* 50; 239–244, 1997.
162. Martinez N., DePeters E.J., Bath D.L.: Supplemental niacin and fat effects on milk composition of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 74:202, 1991.

163. Cervantes A., Smith T.R., Young J.W.: Effects of nicotinamide on milk composition and production in dairy cows fed supplemental fat. *J. Dairy Sci.* 79:105–115, 1996.
164. Drackley J.K., LaCount D.W., Elliott J.P., Klusmeyer T.H., Overton T.R., Clark J.H., Blum S.A. : Supplemental fat and nicotinic acid for Holstein cows during an entire lactation. *J Dairy Sci.* 81: 201–214, 1998.
165. 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⁺ Depletion and Reduced Sir2 α Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* 280:43121–4313, 2005.
166. 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.
167. Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M. W., Guarente L.: Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature.* 429:771–776, 2004.
168. Virag L., Szabo C.: The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 54:375–429, 2002
169. 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.
170. Jackson T.M., Rawling J.M., Roebuck B.D., Kirkland J.B.: Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD⁺ and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats. *J. Nutr.* 125:1455-1461, 1995.
171. Sauve A.A.: NAD⁺ and Vitamin B3 : From metabolism to therapies. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 324(3):883-893, 2008.
172. 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.* 282:24574-24582, 2007.
173. 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.
174. Jacobson E.L., Jacobson M.K.: Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans. *Methods Enzymol.* 280:221–230, 1997.
175. Miller N.J., Burr J.D.R., Saffu P.: Erythrocyte niacin co-enzymes as a measure of vitamin B3 status. Biolab Medical Unit, London W1W 6DB, United Kingdom.
176. 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.

177. Waterman, R., J. W. Schwalm, and L. H. Schultz. Nicotinic acid treatment of bovine ketosis. I. Effects on circulatory metabolites and interrelationships. *J. Dairy Sci.* 55:1447–1453, 1972.
178. Emery R.S., Liesman J.S., Herdt T.H.: Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J. Nutr.* 122:832-837, 1992.
179. Gross J., Kessler E., Albrecht C., Bruckmaier R.M.: Response of the Cholesterol Metabolism to a Negative Energy Balance in Dairy Cows Depends of the Lactational Stage. *PLoS One.* 10(6), 2015.
180. Ganji S.H., Tavintharan S., Zhu D., Xing Y., Kamanna V.S., Kashyap M.L.: Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J. Lipid Res.* 45(10):1835-45, 2004.
181. Assmann G., Gotto A.M.: HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation.* 109(23,Suppl.1):III8–III14, 2004.
182. Đoković R.D., Cincović M.R., Belić B.M.: Fiziologija i patofiziologija metabolizma krava u peripartalnom period. Novi Sad, 2014.
183. Kaneko J.J., Harvey W., Bruss M.L.: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5th edition Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. Appendix VIII: Blood analysis reference values in large animals. 890-894, 1997.
184. Gao Y., Li, J., Jia, W., Li Q., Cao Y.: Response of lactating cows to supplemental rumen protected methionine and Niacin *Front. Agric. China* 2: 121, 2008.
185. Kumar R., Dass R.S.: Effect of niacin supplementation on growth, nutrient utilization and blood biochemical profile in male buffalo calves. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 19 (10):1422-1428, 2006.
186. Gawel S., Wardas M., Niedworok E., Wardas P.: Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad lek.* 57(9-10):453-5, 2004.
187. Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A.: Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 2017–2026, 2005.
188. Wathes D.C., Cheng Z., Bourne N., Taylor V.J., Coffey M.P., Brotherstone S.: Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the interrelationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology.* 33(2): 203-225, 2007.
189. Maedler K., Spinass G.A., Dyntar D., Moritz W., Kaiser N., Donath M.Y.: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes.* 50: 69–76, 2001.
190. Horner J.L., Coppock C., Moya J.R., Labore J.M., Lanham J.K.: Effects of niacin and whole cottonseed on ruminal fermentation, protein degradability, and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 71(5):1239-1247, 1988.

191. Šamanc H, Nikolić AJ, Stojić V, Djoković R, Damjanović Z, Ivanov I.: Glucose tolerance and propionate loading tests in the assessment of endocrine pancreatic function in healthy and ketotic cows. *Acta Vet. Beograd* 46(5-6): 245-254, 1996
192. Jaster E.H., Ward N.E.: Supplemental nicotinic acid or nicotinamide for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73:2880–2887, 1990.
193. Frayn K.N., Coppack S.W.: Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease. *Clin Sci (Lond)*. 82:1-8,1992.
194. Frayn K.N., Williams C.M., Arner P.: Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci (Lond)*. 90:243–253, 1996.
195. Stefan N., Stumvoll M., Bogardus C., Tataranni P.A.: 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.
196. Holtenius P., Holtenius K.: A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta. Vet. Scand.* 49:29–31, 2007.
197. Cincović M., Kirovski D., Vujanac I., Kovačević-Filipović M., Belić B., Đoković R.: Relationship between the indexes of insulin resistance and metabolic status in dairy cows during early lactation. *Acta veterinaria Belgrade*, in press, 2017.
198. Lotthammer K.H.: Level of some blood parameters as indicators for liver disorder-their causes , relations to fertility and possibilities to prevent fertility problems. *Proc. XII World Congr. Dis. Cattle.* 1:527-532, 1982.
199. Đoković R. D., Kurćubić V., Ilić Z., Cincović M.R., Fratrić N., Stanimirović Z., Petrović M.D., Petrović M.P. Evaluation of the metabolic status of Simental dairy cows in early andmid lactation. *Animal Science Papers and Reports.* 31(2): 101-110, 2013.
200. Šamanc H, Kirovski D, Stojić V, Stojanović D, Vujanac I, Prodanović R Ivetić V, Savić B, Kureljušić B.: Application of the metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows, *Acta Vet. Beograd.* 61(6):543-553, 2011.
201. Steen A.: Field study of dairy cows with reduced appetite in early lactation: clinical examinations, blood and rumen fluid analyses. *Acta vet. scand.* 42: 219-228, 2001.
202. Cebra C.K., GarryF.B., Getzy D.M., Fettman M.J.: Hepatic lipidosis in anorectic, lactating Holstein cattle:a retrospective study of serum biochemical abnormalities. *J. Vet. Intern. Med.* 11: 231–237, 1997.
203. Meyer D. J., Harvey J. W. ;Evaluation of hepatobiliary system and skeletal muscle and lipid disorders. In: *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis.* (Meyer, D. J., J. W. Harvey, Eds.) 2nd ed., W.B. Saunders company Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. pp. 157-187, 1998.

204. Gonzalez F. D., Muino R., Pereira V., Campos R., Benedito L.: Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in highyielding dairy cows. *J. Vet. Sci.* 12:251-255, 2011.
205. Chamberlin J., The effects of nicotinic acid supplementation during late/gestation on lipolysis and feed intake during the transition period . MSc thesis, 2006.
206. Patterson D.J., Dew E.W., Gyorkey F., Graham D.Y.: Niacin hepatitis. *South Med J.* 76: 239-241,1983.
207. Mordak R., Nicpon J.: Values of some blood parameters in dairy cows before and after delivery as a diagnostic monitoring of health in herd. *Electr J Pol Agr Univ-Vet Med.* 9(2), 2006.
208. Kupczyński R., Chudoba-Drozdowska B.: Values of selected biochemical parameters of cows blood during their drying-off and the beginning of lactation. *Electr. J. Po.l Agr.Univ.Vet. Med.* 5 (1), 2002.
209. Ghorbani B, Vahdani N., Zerehdaren S.: Effects of niacin on milk production and blood parameters in early lactation of dairy cows. *Pak. J. Biol. Sci.* 11(12):1582-1587, 2008.
210. Cavestany D., Blance J.E., Kucsar M., Uriarte G., Chilbroste P., Meikle A., Febl H., Ferraris A., Krall E.: Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system:Metabolic profiles. *J. Vet. Med. A.* 52:1-7, 2005.
211. Tóthová C.S., Nagy O., Seidel H., Konvičná J., Farkašová Z., Kováč G. Acute Phase Proteins and Variables of Protein Metabolism in Dairy Cows during the Pre- and Postpartal Period. *Acta Vet. Brno.* 77: 51–57, 2008.
212. 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 earlylactation. *Veterianarski arhiv Zagreb.* 6 (83): 593-502, 2013.
213. Zentella P.M., Vázquez-Meza H., Piña-Zentella G., Pimentel L., Piña E.:Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit epinephrine- and cAMP-mediated lipolysis in isolated rat adipocytes. *J .Pharm. Pharmacol.* 54(4):577-82, 2002.
214. Neuschwander-Tetri B.A: Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceridefatty acid metabolites. *Hepatology.* 52:774–788, 2010.
215. Celeska I, Janevski A., Dzadzovski I., Ulchar I., Kirovski D. The dynamics of biochemical parameters in blood of clinically healthy Holstein cows from day 5 before to day 60 after calving. *Mac Vet Rev.* 38 (2):189-193, 2015.
216. Lubojacka V., Pechova A., Dvorak R., Drastich P., Kummer V., Poul J.: Liver steatosis following supplementation with fat in dairy cows diets. *Acta Veterinaria Brno.* 74:217-224, 2005.
217. Erickson P.S., Trusk A.M., Murphy M.R.: Effects of niacin source on epinephrine stimulation of plasma nonesterified Fatty acids and glucose concentrations, on

- diet digestibility and on rumen protozoal numbers in lactating dairy cows. *J Nutr.* 120(12):1648-1653,1990.
218. Newbold C.J., McEwan N.R., Calza R.E., An NAD⁺ dependent glutamate dehydrogenase cloned from the ruminal ciliate protozoan, *Entodinium caudatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 247:113-121, 2005.
219. 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 FeedScience and Technology* 126:237–257, 2006.
220. Li H., Ren P., Onwochei M., Ruch R.J., Xie Z.: Regulation of rat Na/Pi cotransporter-1 gene expression: The roles of glucose and insulin. *Am. J. Physiol.* 271:E1021–E1028, 1996.
221. 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.
222. Djokovic R.D., Cincovic M R., Kurcubic V., Petrovic M., Lalovic M., Jasovic B. Stanimirovic Z.: Endocrine and Metabolic Status of Dairy Cows during Transition Period. *Thai J Vet Med.* 44 (1):59-66, 2014.
223. Bonczek R.R., Young S.W., Wheaton J.E., Miller K.P.: Responses of somatotropin, insulin, prolactin and thyroxine to secretion for milk yield in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 71: 2470-2475, 1988.
224. Veenhuizen J. J., Drackley J. K., Richard M. J., Sanderson T. P., Miller L. D., Young J. W. :Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J. Dairy Sci.* 74:4238–4253, 1991.
225. West H.J.: Effect on liver function of acetonaemia and the fat cow syndrome in cattle. *Research in Veterinary Science.* 48:221-227, 1990
226. Pechova A., Llek J., Halouzka R.:. Diagnosis and control of the development of hepatic lipidosis in dairy cows in the peri-parturient period. *Acta Veterinaria Brno.* 66: 235-243, 1997.
227. Bernard J.K., Quigley J.D., Dowlen H.H., Lamar K.C., Supplemental niacin and heat-treated whole soybeans for Jersey cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 78:2016, 1995.
228. Ottou J.F., Doreau M., Chilliard Y.: Duodenal rapeseed oil infusion in midlactation cows. Interaction with niacin on dairy performance and nutritional balances. *J Dairy Sci.* 78:1345–1352, 1995.
229. Fronk T.J., Schultz L.H.: Oral nicotinic acid as a treatment for ketosis. *J. Dairy Sci.* 62:1804-1807, 1979.
230. Muller, L. D., A. J. Heinrichs, J. B. Cooper, and Y. H. Atkin. Supplemental niacin for lactating cows during summer feeding. *J. Dairy Sci.* 69:1416–1420,1986.

231. Gerloff B.J, Herdt T.H, Emery R.S.: Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. JAVMA. 188:845-850, 1986.
232. Bergen W. G., Mersmann H. J.: Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. J. Nutr. 135:2499-2502, 2005.
233. Ingle D. L., Bauman D. E., Garrigus U. S.: Lipogenesis in the ruminant: in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation for fatty acid synthesis. J. Nutr. 102:609-616, 1972.
234. 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.
235. Houten S.M., Wanders R.J.A.: A general introduction to the biochemistrz of mitochondrial fatty acid β -oxidation, J. Inherit. Metab. Dis. 33:469, 2010.

9.BIOGRAFIJA AUTORA

Talija Hristovska je rođena 18.11.1986 u Bitolju, R.Makedonija. Gimnaziju je završila u Bitolju. Tokom 2011. završava studije veterinarske medicine na veterinarskom fakultetu u Skoplju. Od novembra 2011. do marta 2012. radila je u veterinarskoj praksi. Od juna 2012. izabrana je u zvanje asistenta na Veterinarskom fakultetu u Bitolju na odseku za Farmakologiju i toksikologiju. Iste godine upisuje doktorske studije na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Položila je sve ispite sa prosečnom ocenom 10. Objavila je više od 10 naučnih radova i saopštenja međunarodnog i nacionalnog karaktera. Govori engleski jezik.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Talija Hristovska
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Marko Cincović, docent Dr Dragica Stojanović, red. prof.
Naslov rada: NR	UTICAJ NIACINA NA LIPIDNI PROFIL I METABOLIČKU ADAPTACIJU KRAVA U RANOJ LAKTACIJI
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2017

Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Fizički opis rada: FO	9 poglavlja, 139 strane, 7 šema, 55 grafikona, 70 tabela, 2 slike, 235 reference
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Patološka fiziologija i Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Krave, niacin, metabolički status, insulinska rezistencija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Cilj ove disertacije je da se ispita uticaj aplikacije niacina na metabolizam lipida u peripartalnom periodu, da se utvrdi dali aplikacija niacina utiče na insulinsku rezistenciju, vezu između metaboličkih parametara i lipolize i ketogeneze i uticaj aplikacije niacina na koncentracije NAD i NADP. NAD i NADP predstavljaju adekvatne pokazatelje statusa niacina kod krava u ranoj laktaciji, a njihova vrednost je značajno viša kod krava koje su primale ovaj vitamin. NED i NADP pokazuju pozitivnu korelaciju. Pored ovoga izvedene vrednosti kao što je NAD:NADP indeks i površina ispod krive koju prave ovi vitamini posle teljenja zavise od aplikacije niacina. Aplikacija niacina dovodi do smanjenja koncentracije NEFA, BHB i MDA, a do povećanja koncentracije triglicerida i holesterola u krvi krava. Aplikacija niacina dovodi do porasta koncentracije insulina i glukoze kod krava posle teljenja. Uticaj niacina na insulinsku rezistenciju se mora dvojako posmatrati. Krave koje primaju niacin imaju nižu vrednost indeksa glukoza:insulin, što znači da se po jedinici insulina neutrališe manje glukoze. Ovakvo stanje nastaje jer sa porastom koncentracije insulina opada njegova efikasnost i životinje ulaze u insulinsku rezustenciju. Međutim, RQUICKIBHB indeks insulinske rezistencije je pokazao da su krave koje su primale niacin mnogo osetljivije na insulin, što se može pripisati povećanoj insulinskoj senzitivnosti masnog tkiva. Kod krava koje su primale niacin nađena je niža koncentracija bilirubina i aktivnost AST, ALP i GGT. Nađena je viša koncentracija albumina i viša koncentracija uree i niža koncentracija fosfora. Rezultati pokazuju da aplikacija niacina pozitivno utiče na status hepatocita, a može uticati i na metabolizam proteina u organizmu zbog promena u vrednosti uree. Promena metaboličkih parametara posle teljenja išla je u istom pravcu u ogleđnoj i kontrolnog grupu, samo se menjao intenzitet promena u funkciji aplikacije niacina. Parcijalna korelacija pokazuje da vitamini niacina mogu objasniti određeni deo korelacije koji postoji između lipolize, ketogeneze i metaboličkim parametrima. Stopa promene veze između</p>

	<p>metaboličkih parametara sa NEFA i BHB zavisi od stope promene statusa niacina u organizmu krava u ranoj laktaciji. Naknadnim istraživanjima treba odrediti kauzalnu prirodu ovih veza. Krave koje su primale niacina pokazivale su tendenciju povećane proizvodnje mleka do 30. dana laktacije. Ovakav uticaj niacina se izgubio prilikom merenja u 60. danu laktacije. Krave sa boljim statusom niacina (viša vrednost NAD i NADP) pokazuju manji stepen zamašćenja i bolju vitalnost hepatocita, a nađen je i veći dijametar adipocita u potkožnom masnom tkivu, što se može pripisati antilipoliznom efektu niacina.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: Prof.dr Milanka Jezdimirović</p> <p>mentor: Doc.dr Marko Cincović</p> <p>mentor: Prof.dr Dragica Stojanović</p> <p>član: Prof.dr Branislava Belić</p> <p>član: Prof.dr Bojan Toholj</p>

University of Novi Sad

Faculty of Agriculture

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed matherial
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Talija Hristovska
Mentor: MN	Dr Marko Cincović, docent Dr Dragica Stojanović, red.prof.
Title: TI	INFLUNCE OF NIACIN ON LIPIDE PROFILE AND METABOLIC ADAPTATION IN DAIRY COWS DURING EARLY LACTTION
Language of text: LT	Srpski
Language of abstract: LA	srp. / eng.
Country of publication: CP	Srbija
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	Novi Sad Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	9 chapters, 139 pages, 7 schemes, 55 charts, 70 tables, 2 images, 235 references

Scientific field SF	Veterinarska medicina
Scientific discipline SD	Patološka fiziologija i Farmakologija
Subject, Key words SKW	Krave, niacin, metabolički status, insulinska rezistencija
UC	
Holding data: HD	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta
Note: N	
Abstract: AB	<p>The aim of this dissertation is to examine the effect of niacin on lipid metabolism in perparturient period, to determine does application of niacin have effects on insulin resistance, relationship between metabolic parameters and lipolysis and ketogenesis and effects of application of niacin on NAD and NADP concentration in plasma. NAD and NADP present the adequate indicator of the status of niacin in cows in early lactation, and concentration of NAD and NADP is significant increase in cows that were treated with niacin. NAD and NADP demonstrate positive correlation. Despite this, the derived values like NAD:NADP ratio and area under the curve depends of the application of niacin. Application of niacin leads to decreased NEFA, BHB and MDA plasma concentration, and increased triglyceride and cholesterol concentration in plasma in cows. Application of niacin leads to increased concentration of insulin and glucose in plasma after partum. The effect of niacin on insulin resistance may have two sides. Cows that received niacin had lower value of glucose:insulin ratio, that means that one unit of insulin metabolized less glucose. This state became because with increased insulin concentration decreased its efficiency and animals obtained insulin resistance. On the other hand index RQUICKIBHB for insulin resistance showed that cows that received niacin were much more sensitive to insulin, and that may be as a result of increased insulin sensitivity in adipose tissue. Cows that have received niacin bilirubin concentration and activity of AST, ALP and GGT were decrease. Albumin concentration was increased, urea and phosphor concentration was decreased in group that had received niacin. Results indicate that application of niacin have positive impact on status hepatocytes, and may have influence on protein metabolism in organism because of alteration on value in urea. In control and niacin group alteration on metabolic parameters after partum went on the same direction, but intensity of changing was in function of application of niacin. Partial correlation indicates that niacin vitamers may explain certain part of correlation that exists between lipolysis, ketogenesis, and metabolic parameters. Rate changes of the relationship between metabolic parameters with NEFA and BHB depends of the rate changes of the niacin status in cows in early lactation. Subsequent research should determinate the causal nature of this relationship. Cows that have received niacin were demonstrating tendency of increased milk production until 30.day lactation. This impact of niacin was lost in 60.day of lactation. Cows with better status niacin (greater value of NAD and NADP) manifest smaller grade of hepatic lipidosis and better vitality of hepatocytes, and was found bigger</p>

	diameter on subcutaneous adipocytes, which can be as a result of antilipolytic effects of niacin.
Accepted on Senate on: AS	
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	predsednik: Prof.dr Milanka Jezdimirović mentor: Doc.dr Marko Cincović mentor: Prof.dr Dragica Stojanović član: Prof.dr Branislava Belić član: Prof.dr Bojan Toholj