

## UTICAJ APLIKACIJE NIACINA NA VREDNOST NJEGOVIH VITAMERA U KRVU KRAVA U RANOJ LAKTACIJI

*Talija Hristovska<sup>1</sup>, Kosta Petrović<sup>2</sup>, Marko Cincović<sup>2</sup>, Branislava Belić<sup>2</sup>,  
Maja Došenović Marinković<sup>2</sup>, Radojica Đoković<sup>3</sup>, Miloš Petrović<sup>3</sup>,  
Dražan Kovačević<sup>2</sup>*

**Izvod:** Vitamin niacin je od velike važnosti za energetske metabolizam. Fiziološki niacin se inkorporira u koenzim nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP). Cilj ovog rada je da se utvrdi koncentracija NAD i NADP u krvi krava prilikom aplikacije niacina u peripartalnom periodu. Vrednost vitamina niacina NAD i NADP značajno raste kod krava usled aplikacije niacina putem hrane, ali se NAD:NADP odnos nije menjao pod dejstvom egzogenog niacina. Vrednost ovih vitamina zavisi od peripartalne nedelje bez obzira na dodavanje egzogenog niacina.

**Ključne reči:** krave, niacin, vitamini, koncentracija.

### Uvod

Vitamin niacin je od velike važnosti za energetske metabolizam (Hristovska i sar., 2017a,b; Cincović i sar., 2018). Fiziološki niacin se inkorporira u koenzim 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<sup>+</sup> 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 (Pires i Grummer, 2007; Tunaru i sar., 2003). Nikotinamid je reaktivna polovina NAD i NADP koji su koenzimi (kosubstrati) velikom broju oksidativnih i reduktivnih reakcija. Enzimi koji sadrže

<sup>1</sup>Univerzitet „Sv.Kliment Ohridski“ Bitolj, Veterinaren fakultet, Prilepska bb, Bitola, S.Makedonija;

<sup>2</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Departman za veterinarsku medicinu-Poljoprivredni fakultet, Trg D.Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija ([mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com));

<sup>3</sup>Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Ul. Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Srbija.

NAD i NADP su važne veze u seriji reakcija u metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i masti (Niehof i sar., 2008).

Cilj ovog rada je da se utvrdi koncentracijaj NAD i NADP u krvi krava prilikom aplikacije niacina u peripartalnom periodu.

### Materijal i metode rada

Životinje i protokol studije: Krave su podeljene u dve grupe, niacin i kontrolnu, po 15 krava u svakoj grupi. Grupa sa niacinom je tretirana nikotinskom kiselinom 2 nedelje pre očekivanog porođaja i 2 nedelje nakon porođaja. Nikotinska kiselina je primenjivana per os uz hranu, 120 grama dnevno po kravi, 28 dana za redom. Nikotinska kiselina je bila u obliku nezaštićenog za burag (Rovimik@Niacin, F. Hoffmann-La Roche AG, Švajcarska).

Uzimanje i analiza krvi: Uzorci krvi su uzeti pre jutarnjeg hranjenja punkcijom kokcigealne vene. Uzorci krvi su uzeti četiri puta u obe grupe. Prvi put uzorci krvi su uzeti pre primene niacina (-1. nedelja), drugi put na dan teljenja i drugi put tokom prve i druge nedelje nakon porođaja (0., 1., 2. nedelja). Uzorci krvi za analizu su sakupljeni u epruvete sa litijum heparinom od 3 mL (BD Vacutainer tubes@PST) i odgovarajuće obeleženi. Uzorci su čuvani na suvom ledu i zaštićeni od svetlosti do laboratorijske analize. Uzorci su analizirani odmah nakon uzorkovanja.

Merenje parametara krvi: Određeni su parametri kao što su NAD, NADP i NAD/NADP odnos. NAD i NADP su određeni kolorimetrijskom ELISA metodom iz lizata eritrocita. Enzimi u sistemu specifično prepoznaju NAD:NADP u reakciji ciklusa enzima, nema potrebe za prečišćavanjem NAD:NADP iz jednostavne mešavine. Reakcija ciklusa enzima značajno povećava osetljivost detekcije. Koncentracija NAD i NADP izražena je u pmol/10<sup>6</sup> eritrocita. Dobijeni broj je za eritrocite u jednom mL krvi, a kada se rezultati pomnože sa 100 dobija se vrednost za NAD i NADP u jednom mL. Korišćeni su kompleti proizvođača Abcam. Odnos NAD:NADP se izračunava jednostavnim deljenjem dva broja. Korišćeni su reagensi marke *Abcam* je čitač marke *Rayto*.

Statističke analize: Efekti primene niacina na vrednosti NAD, NADP i NAD:NADP odnosa analizirani su tokom eksperimentalnih nedelja. GLM model je korišćen za uticaj grupe, nedelje i interakcije grupa×sedmica. U ove svrhe korišćen je statistički softver SPSS 20.0 (IBM).

### Rezultati istraživanja i diskusija

Vrednost NAD bila je u rasponu od 860 do 895 pmol L<sup>-1</sup> u kontrolnoj grupi bez obzira na nedelju oglada. Vrednost NAD kod krava koje su primale niacin iznosila je u nedelji teljenja (0 nedelja) 1724,6 pmol L<sup>-1</sup>, u prvoj nedelji po teljenju 1968,6 pmol L<sup>-1</sup> u drugoj nedelji po teljenju 1771,8 pmol L<sup>-1</sup>. 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.

Vrednost NADP bila je u rasponu od 385,09 do 425,62 pmol L<sup>-1</sup> u kontrolnoj grupi bez obzira na nedelju ogleada. Vrednost NADP kod krava koje su primale niacin iznosila je u nedelji teljenja (0 nedelja) 704,45 pmol L<sup>-1</sup>, u prvoj nedelji po teljenju 778,36 pmol L<sup>-1</sup> i u drugoj nedelji po teljenju 796,18 pmol L<sup>-1</sup>. 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.

Sledeći značajan parametar je odnos NAD/NADP, koji nije pokazao statističku značajnu razliku između grupe koja je primala niacin i koja nije primala niacin.

Tabela 1. Uticaj aplikacije niacina i nedelje nedelje na koncentraciju vitamera niacian

Table 1. Influence of niacin application and periparturient week on vitamins concentration

Vitameri Vitamins	Nedelja Week	Grupa Group	Srednja vr. Average	SD SD	Grupa Group	Nedelja Week	Grupa×Nedelja Group×Week
NAD (pmol L <sup>-1</sup> )	-1	Control	898,30	183,30	p<0,001	p<0,01	p<0,01
		Niacin	862,30	90,20			
	0	Control	904,60	184,60			
		Niacin	1724,6	180,40			
	1	Control	889,30	181,40			
		Niacin	1968,6	207,10			
2	Control	895,60	182,70				
	Niacin	1771,8	186,40				
NADP (pmol L <sup>-1</sup> )	-1	Control	425,62	65,78	p<0,001	p<0,01	p<0,01
		Niacin	422,67	39,98			
	0	Control	405,36	62,65			
		Niacin	704,45	66,64			
	1	Control	385,09	59,52			
		Niacin	778,36	70,34			
2	Control	397,25	61,40				
	Niacin	796,18	75,77				
NAD/ NADP	-1	Control	2,04	0,17	NS	NS	NS
		Niacin	2,01	0,15			
	0	Control	2,45	0,19			
		Niacin	2,58	0,22			
	1	Control	2,54	0,28			
		Niacin	2,60	0,20			
2	Control	2,23	0,18				
	Niacin	2,60	0,19				

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 (Pillai i sar., 2005; Fulco i sar., 2003; Picard i sar., 2004). Takođe, postoji povezanost NAD sa oksidativnim stresom, pa tako u srčanom tkivu čoveka oksidativni stres indukuje smanjenje celularnih rezervnih zaliha NAD-a i što dovodi do smrti kardiomiocita (Virag i Szabo, 2002). Sa druge strane, obnavljanje ovih zaliha NAD-a mogu da zaštite ćelije od povrede i izumiranja. 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 biositezu NAD-a iz nikotid amida kod sisara. Studije pokazuju da je nivo ekspresije Nampt u korelaciji sa koncentracijom NAD<sup>+</sup> u ćeliji (Revollo i sar., 2004), a 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<sup>-1</sup>) 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 (Jackson i sar., 1995). 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 (Sauve, 2008). Hara i sar. (2007) 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 supstrat za povećanje celularnog nivoa NAD-a od nikotinamida.

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 Jacobson., 1997). Skoro sve krave ogleadne grupe imale su NAD/NADP odnos viši od 2. Odnos NAD/NADP koji je viši od 2.5, ukazuje na optimalan status niacin u organizmu. Ovakve vrednosti NAD/NADP odnosa kod krava koje su primile niacin ukazuju na to da status niacina zavisi od njegove aplikacije. 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. Poznato je da je eritrocitna koncentracija NADP najčešće konstantna, a svaka redukcija eritrocitnog NAD redukuje NAD/NADP odnos i obratno. Fu i sar. (1989) sugerišu da svaki indeks niacina ispod 1.0 može biti indicacija za razvoj deficita niacina kod ljudi.

## Zaključak

Vrednost vitamena niacina NAD i NADP značajno raste kod krava usled aplikacije niacina putem hrane, ali se NAD:NADP odnos nije menjao pod dejstvom egzogenog niacina. Vrednost ovih vitamina zavisi od peripartalne nedelje bez obzira na dodavanje egzogenog niacina.

## Literatura

- Cincović M., Hristovska T., Belić B. (2018). Niacin, Metabolic Stress and Insulin Resistance in Dairy Cows. In, B group vitamins current uses and perspectives. 107-125, Intech Open, London United Kingdom.
- Fu C.S., Swendseid M.E., Jacob R.A., McKee R.W. (1989). Biochemical markers for assessment of niacin status in young men: levels of erythrocyte niacin coenzymes and plasma tryptophan. *Journal of Nutrition*, 119, 1949–55.
- Fulco M., Schiltz R. L., Iezzi S., King M. T., Zhao P., Kashiwaya Y., Hoffman E., Veech R. L., Sartorelli V. (2003). Sir2 Regulates Skeletal Muscle Differentiation as a Potential Sensor of the Redox State. *Molecular Cell*, 12, 51–62.
- Hara N., Yamada K., Shibata T., Osago H., Hashimoto T., Tsuchiya M. (2007). Elevation of Cellular NAD Levels by Nicotinic Acid and Involvement of Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase in Human Cells. *Journal of biological chemistry*, 28, 24574-24582.
- Hristovska T., Cincović M., Belić B., Stojanović D., Jezdimirović M., Djoković R., Toholj B. (2017a). Effects of niacin supplementation on the insulin resistance in Holstein cows during early lactation. *Acta Veterinaria Brno*, 86, 231-238.
- Hristovska T., Cincović M., Stojanović D., Belić B., Kovačević, Z., Jezdimirović, M. (2017b). Influence of niacin supplementation on the metabolic parameters and lipolysis in dairy cows during early lactation. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23, 773-778.
- Jackson T.M., Rawling J.M., Roebuck B.D., Kirkland J.B. (1995). Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD<sup>+</sup> and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats. *Journal of nutrition*, 125, 1455-1461.
- Jacobson E.L., Jacobson M.K. (1997). Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans. *Methods Enzymol*, 280, 221–30.
- Niehoff I.D., Hüther L., Lebzien P. (2008). Niacin for dairy cattle: a review. *British Journal of Nutrition*, 101, 5-19.
- Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M.W., Guarente L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature*, 429, 771–776.
- Pillai J. B., Isbatan A., Imai S., Gupta M. P. (2005). Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-dependent Cardiac Myocyte Cell Death during Heart Failure Is Mediated by NAD<sup>+</sup> Depletion and Reduced Sir2 $\alpha$  Deacetylase Activity. *Journal of biological chemistry*, 280, 43121–4313, 2005.

- Pires J.A.A., Grummer R.R. (2007). The use of nicotinic acid to induce sustained low plasma nonesterified fatty acids in feed-restricted Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 3725–3732.
- Revollo J.R., Grimm A.A., Imai S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *Journal of biological chemistry*, 279, 50754–50763.
- Sauve A.A. (2008). NAD<sup>+</sup> and Vitamin B3: From metabolism to therapies. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324, 883–893.
- Tunaru S., Kero J., Schaub A., Wufka C., Blukat A., Pfeffer K., Offermanns S. (2003). PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its antilipolytic effect. *Nature medicine*, 9, 352–355.
- Virag L., Szabo C. (2002). The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacological reviews*, 54, 375–429.

## INFLUENCE OF NIACIN APPLICATION ON THE VALUE OF ITS VITAMERS IN THE BLOOD OF COWS IN EARLY LACTATION

*Talija Hristovska<sup>1</sup>, Kosta Petrović<sup>2</sup>, Marko Cincović<sup>2</sup>, Branislava Belić<sup>2</sup>, Maja Došenović Marinković<sup>2</sup>, Radojica Đoković<sup>3</sup>, Miloš Petrović<sup>3</sup>, Dražen Kovačević<sup>2</sup>*

### Abstract

Vitamin niacin is of great importance for energy metabolism. Physiological niacin is incorporated into the coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). The aim of this study was to determine the concentration of NAD and NADP in the blood of cows during the application of niacin in the peripartum period. The value of these vitamins depends on the peripartum week, regardless of the constant exogenous source of niacin.

**Key words:** cow, niacin, vitamers, concentration

---

<sup>1</sup>University "St. Kliment Ohridski" Bitola, Faculty of Veterinary Medicine, Prilepska bb, Bitola, S. Macedonia;

<sup>2</sup>University of Novi Sad, Department of Veterinary Medicine-Faculty of Agriculture, Square D. Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia ([mcincovic@gmail.com](mailto:mcincovic@gmail.com));

<sup>3</sup>University of Kragujevac, Faculty of Agronomy in Čačak, Street Cara Dušana 34, 32000 Čačak, Serbia.