

**UTICAJ APLIKACIJE NIACINA NA VREDNOSTI TNF- $\alpha$ ,  
HAPTOGLOBINA I FIBRINOGENA KOD KRAVA U  
PERIPARTALNOM PERIODU**

***INFLUENCE OF NIACIN APPLICATION ON TNF- $\alpha$ ,  
HAPTOGLOBIN AND FIBRINOGEN VALUES IN COWS IN  
PERIPARTAL PERIOD***

**Kosta Petrović<sup>a\*</sup>, Filip Štrbac<sup>b</sup>, Dragica Stojanović<sup>b</sup>**

*<sup>a</sup>Poljoprivredna škola sa domom učenika u Futogu, Carice Milice 2, Novi Sad, Srbija*

*<sup>b</sup>Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg  
Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad*

*<sup>a</sup>Agricultural school with dormitory in Futog, Carice Milice 2, Novi Sad, Serbia*

*<sup>b</sup>University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Trg Dositeja  
Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia*

*\*Autor za kontakt: [kostapetrovic84@gmail.com](mailto:kostapetrovic84@gmail.com)*

**SAŽETAK**

Peripartalni period kod krava predstavlja stanje metaboličkog stresa koje se karakteriše različitim negativnim efektima. U ovom radu su opisani inflamatorni procesi kod krava u peripartalnom periodu. Naime, opisano je delovanje citokina, kao i interakcija citokina, metabolita i jetre kao centralnog metaboličkog organa. Prikazana je inflamacija tkiva u peripartalnom periodu sa posebnim osvrtom na značaj faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ). U tom kontekstu, ispitan je uticaj aplikacije niacina kod krava na regulisanje inflamatornog odgovora kroz merenje vrednosti TNF- $\alpha$ , haptoglobina i fibrinogena i poređenje sa kontrolnom grupom. Smanjenje koncentracije TNF- $\alpha$  i haptoglobina pod uticajem niacina ukazuje na njegov antiinflamatorni efekat, što sugerise na značaj njegove primene kod krava u peripartalnom periodu.

Ključne reči: krave, inflamacija, niacin, TNF- $\alpha$

---



## ABSTRACT

The peripartum period in cows represents a state of metabolic stress characterized by various negative effects. This paper describes the inflammatory processes in cows during the peripartum period. Namely, it describes the action of cytokines, as well as the interactions of cytokines, metabolites and the liver as the central metabolic organ. Tissue inflammation in the peripartum period is presented with a particular focus on the importance of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Within this context, the influence of niacin application in cows on the regulation of the inflammatory response was examined by measuring the values of the TNF- $\alpha$ , haptoglobin and fibrinogen and comparing it with the control group. The decrease in the concentration of TNF- $\alpha$  and haptoglobin under the influence of niacin indicates its anti-inflammatory effects, which suggests the importance of its use in cows in the peripartum period.

*Key words: cows, inflammation, niacin, TNF- $\alpha$*

## UVOD

Najčešći zapaljenski procesi koji mogu nastati u periodu rane laktacije su metritis koga uzrokuje zadržavanje posteljice i mastitis. Bilo koji od navedenih procesa, a neretko i oba dodatno ozbiljno komplikuju i otežavaju već opterećene metaboličke procese homeorezom u puerperijumu. Štetni efekat zapaljenski procesi ispoljavaju stimulacijom simpatikusa kojom se pokreće lipoliza, pri čemu je ujedno izazivaju i odsustvo apetita i smanjen unos hrane (1). Zapaljenski procesi su uvek praćeni oslobađanjem proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , interleukin 1 i 6) iz leukocita. Citokini stimulišu aktivnost imunološkog sistema, podižu telesnu temperaturu, pri čemu troše visok procenat energije (2). Inflatorni procesi nepovoljno utiču i na dejstvo insulina remeteći njegov metabolički zadatak stimulacije ulaska glukoze u ćeliju, što je posebno uočljivo kod krava sa masnom jetrom.

Niacin ispoljava antilipolitički efekat i dovodi do smanjenja lipolize i insulinske rezistencije u ranoj laktaciji i utiče pozitivno na funkcionalni status jetre (3).

Ono što je do sada malo poznato jeste da li niacin pored antilipolitičkog dejstva može imati i antiinflamatorno dejstvo i kako se odražava na stanje upale celog organizma. Cilj ovog rada je bio utvrditi uticaj niacina na inflamatorni odgovor kroz analizu i praćenje medijatora upale, pri čemu su u ovom radu ispitani faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), haptoglobin i fibrinogen.

## MATERIJAL I METODE

Ogled je izvršen na 30 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, bez znakova poremećaja zdravlja, uz proizvodnju mleka oko 7500 litara. Krave su gajene u slobodnom sistemu, na dubokoj prostirci, ali se u tranzicionom periodu bile u porodilištu, gde je postojao vezani sistem. Ishrana krava je obročna, dok je u porodilištu posle partusa bila po volji. 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). 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.

Određivanje koncentracije TNF- $\alpha$  je vršeno pomoću hemilumiscentne imunotest ELISA metode. Koncentracija fibrinogena je određivana pomoću sendvič ELISA metode, pri čemu je mikrotitarska ploča prethodno obložena sa antitelom specifičnim za fibrinogen. Slično kao u slučaju fibrinogena, određivanje koncentracije haptoglobina je vršeno pomoću sendvič ELISA metode, a mikrotitarska ploča je prethodno obložena sa antitelom specifičnim za haptoglobin.

## REZULTATI

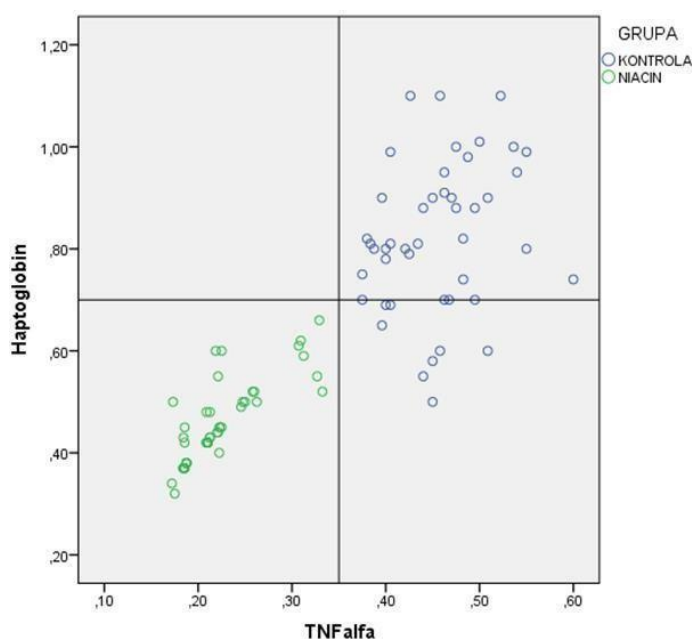
Iz rezultata prikazanih u tabeli se jasno uočava značajan uticaj niacina na vrednosti TNF- $\alpha$  i haptoglobina, dok se uticaj na vrednost fibrinogena nije ispoljio. Na osnovu analize rezultata iz tabele, potrebno je bilo utvrditi da li kombinovani uticaj aplikacije niacina i izmerene koncentracije TNF- $\alpha$  kod krava utiče na vrednosti inflamatornih parametara u krvi krava, te je utvrđen značajan uticaj na vrednost haptoglobina.

Tabela 1. Uticaj aplikacije niacina na vrednost inflamatornih pokazatelja TNF- $\alpha$ , haptoglobina i fibrinogena

GRUPA	KONTROLA			NIACIN			Značajnost t-test
	Zavisna varijabla	N	Srednja vrednost	Std. devijacija	N	Srednja vrednost	
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	45	0,4554	0,05391	45	0,2241	0,04472	<0,01
Haptoglobin (ng/mL)	45	0,8233	0,14843	45	0,4602	0,08209	<0,01
Fibrinogen (ng/mL)	45	0,9397	0,10900	45	0,9193	0,12349	NS

U analizi dijagrama rasturanja jasno se uočava razdvajanje krava (zeleno su označene krave koje su primale niacin) u odnosu na kontrolnu grupu krava (označeno plavim). Između haptoglobina i TNF- $\alpha$  postoji pozitivna korelacija.

Analizom dijagrama rasturanja jasno se vidi da postoji utvrđeni smer regresije, a pored navedenog vidi se jasna podela između vrednosti ispitivanih parametara u ogleđnoj i kontrolnoj grupi, što govori u prilog značajnosti upotrebe niacina kao antiinflamatornog medijatora.



Grafik 1. Dijagram rasturanja Haptoglobin/ TNF-alfa

Citokini u jetri izazivaju stvaranje pozitivnih proteina akutne faze (+AP), haptoglobina, serumamiloida-A i ceruloplazmina, a smanjuju sintezu negativnih proteina akutne faze (-AP), odnosno albumina, transferina, apolipoproteina i retinol-vezujućeg proteina (4). Pomenuti proteini su poznatiji kao proteini akutne faze, a radi se o akutnofaznoj reakciji koja ima ulogu zaštite domaćina. U bilo kom proizvodnom periodu krave su izložene brojnim agensima, a da bi sve štetne nokse bile pod kontrolom, imunološki sistem mlečnih krava je veoma aktivan, posebno u periodu puerperijuma tj. pred teljenje i na početku laktacije. Imunološki sistem se sastoji od urođenog i stečenog imuniteta, a ćelije koje sačinjavaju urođeni imunitet su: leukociti, citokini, eikosandini. Upravo su ove ćelije odgovorne za zaštitu organizma od samog rođenja (5). Već je istaknuto da akutni inflamatorni odgovor direktno pokreće metritis i mastitis, što se ubrzo odrazi na metabolizam, najpre masti i glukoze. Naime, akutni inflamatorni odgovor dovodi do povećanja nivoa glukoze, prilikom čega ovo povećanje traje kratko i zatim nastaje hipoglikemija (6). Posledica pojačane lipolize i razgradnje masnog tkiva je povećanje koncentracije NEFA u krvnoj plazmi. Visok nivo NEFA kod akutnog inflamatornog odgovora može da pokrene inflamatorni put nuklearnog faktora-kB (NF-kB) i ciklooksigenazne puteve, te se tako oslobađaju proinflamatorni citokini. Kako se u podacima iz literature navodi, inflamatorni put NF-kB je neki vid spone između inflamacije i metaboličkih bolesti (7). Prema navodima drugih autora (8), NF-kB inflamatorni put je direktno uključen i igra važnu ulogu u nastanku insulinske rezistencije. Sa drugog aspekta, NEFA i TNF- $\alpha$  aktiviraju kinazu koja dalje fosforiliše inhibitorni protein KB-b (IKK- $\beta$ ), pri čemu ove promene dovode do izostanka aktivacije protein kinaze B i utiču na

povećanje prisustva transportnog molekula za glukozu (GLUT-4). Time se povećava osetljivost na insulin i samim tim smanjuje insulinska rezistencija (9). Haptoglobin putem formiranja kompleksa sa hemoglobinom ispoljava bakteriološki efekat, jer sprečava gubitak gvožđa i direktan je pokazatelj akutne inflamacije, pošto mu se tokom infekcije povećava koncentracija (10). U ovom istraživanju je pokazan uticaj niacina na TNF- $\alpha$  i haptoglobin, s obzirom da je niacin doveo do značajnog smanjenja vrednosti ovih važnih medijatora inflamacije. Dokazano je da koncentracija haptoglobina uvek raste u serumu krava sa mastitisom različite etiologije, te tako haptoglobin može biti jedan od pokazatelja zapaljenske reakcije (11). Fokus interesovanja velikog broja istraživača poslednjih godina upravo je istraživanje proteina akutne faze kroz ceo peripartalni period. Saznanje o uticaju haptoglobina na inflamaciju je poznato još sa kraja dvadesetog veka, a ustanovljeno je da se povećanje koncentracije haptoglobina dešava pre, za vreme i posle teljenja, prilikom čega može da potraje i do dva meseca od partusa kod krava sa inflamatornim procesima.

Haptoglobin i fibrinogen predstavljaju pozitivne proteine akutne faze. Pored poznate uloge fibrinogena u procesu zgrušavanja krvi, dokazano je i njegovo učestvovanje u regulaciji zapaljenskog procesa (12). U procesu hemostaze, fibrinogen indukuje intracelularnu mobilizaciju kalcijuma, utiče na fosforilaciju, aktivira NF-Kb, adheziju i migraciju (13). Već dugi niz godina fibrinogen se kod krava koristi za dokazivanje upalnih procesa kod pneumonija, mastitisa, metritisa, perikarditisa, endokarditisa, peritonitisa i nefritisa (14). Za razliku od TNF- $\alpha$  i haptoglobina (čije vrednosti su dvostruko smanjene), vrednost fibrinogena se nije značajno menjala.

Osim fibrinogena, i citokini su odgovorni za zapaljenske promene i samu aktivaciju imunog sistema. Kod svih infekcija

nezavisno da li je reč o bakterijskoj, virusnoj, parazitskoj ili gljivičnoj etiologiji, podiže se koncentracija svih citokina, između ostalih i TNF- $\alpha$ . Prema istraživanjima više autora, zabeležene su primetno više koncentracije TNF- $\alpha$  kod krava sa upalnim procesima, posebno kod onih kod kojih je eksperimentalno izazvana pleuropneumonija (15). TNF- $\alpha$  beleži više vrednosti čak i kod krava sa mastitisom, čiji je uzročnik *E.colli*. U ovom radu je zabeležen porast vrednosti TNF- $\alpha$  u peripartalnom periodu, a isto tako je pokazan i uticaj niacina na smanjenje vrednosti ovog važnog medijatora upale. Prema podacima iz literature, pored TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  takođe izaziva aktivaciju makrofaga (16) i beleži više vrednosti kod upalnih procesa multipne etiologije.

Pored pomenutih TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  citokina, beleži se povećanje i IL-1 $\beta$  i IL-6 neposredno pred teljenje, prilikom čega se vrednosti ovih citokina već nedelju dana nakon teljenja vraćaju u fiziološke. U nekim ispitivanjima utvrđeno je da jači proinflamatorni odgovor na bakterijsku infekciju nastaje baš u prvoj nedelji posle teljenja, kada su vrednosti opisanih citokina visoke (17). Proinflamatorni citokini sa povećanjem koncentracije dovode do niza poremećaja, pa se tako često mogu dovesti u vezu i sa plodnosti kod krava. Naime, kod krava koje su bile neplodne, izmerena je viša koncentracija IL-1 (IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ ). Pomenuti citokini se zatim dalje dovode u vezu sa metaboličkim poremećajem i prestrojavanjem u ranoj laktaciji, te nastankom pojačane lipidne mobilizacije i ketogeneze (5).

Sasvim je izvesno da period rane laktacije karakteriše smanjenje koncentracije albumina, hemoglobina i holesterola i pored povećanog nivoa proinflamatornih citokina i proteina akutne faze (18). Ako se zna da se albumini stvaraju u jetri, a jetra je u peripartalnom periodu maksimalno opterećena, nameće se zaključak da je snižena albuminemija u direktnoj korelaciji sa opterećenom funkcijom jetre (6). Dakle, produkcija albumina je smanjena za vreme

trajanja inflamatornih i infektivnih oboljenja, a kada je reč o međusobnom uticaju inflamatornih i metaboličkih poremećaja, dokazano je da povećana koncentracija NEFA u plazmi može uticati na smanjenje efikasnosti limfocita (19). Povećana koncentracija NEFA u cirkulaciji kod mlečnih krava može indirektno izazvati zapaljenje i uticati na intezitet i trajanje zapaljenja, jer NEFA se koriste kao prekursori inflamatornih eikosandina, poznatih medijatora zapaljenja.

Kod krava sa masnom jetrom je primećena korelacija koja se dovodi u vezu sa međusobnim uticajem između masne infiltracije i povećanjem koncentracije indikatora zapaljenja, najpre haptoglobina i serumamiloida A (18). TNF- $\alpha$  takođe prati ovaj patofiziološki proces i dovodi se u vezu sa masnom jetrom, s obzirom da mu se povećava aktivnost. Međusobni odnos između indikatora zapaljenja i masne jetre može biti obostran, što je i pokazano kada je vršena parenteralna primena TNF- $\alpha$  u trajanju od 7 dana, kod krava. Efekat je bio u vidu dvostruko veće koncentracije triglicerida, dok je sa druge strane pokazano da inflamatorne promene dovode do metaboličkih poremećaja. Najvažniju ulogu u izazivanju inflamatornog odgovora imaju oksidativni stres i lipidi. Dokazano je da ubrzani procesi lipidne peroksidacije mogu dovesti do nastanka oksidativnog stresa sa posledicom opadanja funkcije inflamatornog i imunološkog odgovora (20).

## ZAKLJUČAK

Aplikacija niacina značajno utiče na vrednost TNF- $\alpha$  i haptoglobina tako što dovodi do opadanja vrednosti ovih medijatora upale. Sa druge strane, aplikacija niacina nije imala statistički značajan uticaj na vrednost fibrinogena kao pokazatelja inflamacije. Ipak, dobijeni rezultati ukazuju na pozitivan efekat primene niacina na metaboličku adaptaciju krava u ranoj laktaciji u kontekstu njegovog antiinflamatornog dejstva.



## ZAHVALNOST

Rad je rezultat projekta “Značaj određivanja i klinička evaluacija serumskog faktora nekroze tumora (TNF- $\alpha$ ) u proceni inflamatornog odgovora preživara i pasa”, Pokrajinski sekretarijat za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost Novi Sad.

## LITERATURA

1. Urton G., von Keyserlingk M.A.G., Weary D.M. Feeding behavior identifies dairy cows at risk for metritis. *Journal of Dairy Science* 2005, 88(8):2843-2849.
2. Johnson R.W., Finck B.N. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and leptin: two players in an animal's metabolic and immunologic responses to infection. *Journal of Animal Science* 2001, 79 (suppl\_E):E118–E127.
3. Petrović K., Stojanović D. Uticaj anti-inflamatornog efekta niacina na enzime jetre i oksidativni stres krava u ranoj laktaciji. *Veterinarski Pregled* 2020, 1(1):105-111.
4. Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2008, 91(9):3300-3310.
5. Sordillo L.M., Contreras G.A., Aitken S.L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews* 2009, 10(1):53-63.
6. Kushibiki S., Hodate K., Ueda Y., Shingu H., Mori Y., Itoh T., Yokomizo Y. Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor- $\alpha$  affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers. *Journal of Animal Science* 2000, 78(8):2164-2171.
7. Baker R.G., Hayden M.S., Ghosh S. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism* 2011, 13(1):11-22.
8. Arkan M.C., Hevener A.L., Greten F.R., Maeda S., Li Z., Long J.M., Wynshaw-Boris A., Poli G., Olefsky J., Karin M. IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 2005, 11(2):191-198.
9. Shulman G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2000, 106(2):171-176.
10. Burtis C.A., Ashwood E.R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed.* Saunders Company, London, 1999.
11. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N., Yokota H., Okada H., Kawamura S. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *Journal of Veterinary Medical Science* 2001, 63(9):1021-1025.
12. McSherry B.J., Horney F.D., deGroot J.J. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1970, 34(3): 191-197.

13. Flick M.J., Du X., Degen J.L. Fibrinogen-alpha M beta 2 interactions regulate leukocyte function and innate immunity in vivo. *Experimental Biology and Medicine* 2004, 229(11):1105- 1110.
14. Hirvonen J., Pyörälä S., Jousimies-Somer H. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *Journal of Dairy Research* 1996, 63(3):351-360.
15. Sacchini F., Luciani M., Salini R., Scacchia M., Pini A., Lelli R., Naessens J., Poole J., Jores J. Plasma levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia. *BMC Veterinary Research* 2012, 8:44.
16. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004, 75(2):163-189.
17. Herath S., Lilly S.T., Santos N.R., Gilbert R.O., Goetze L., Bryant C.E., White J.O., Cronin J. and Sheldon I.M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7(55):1-13.
18. Ametaj B.N., Bradford B.J., Bobe G., Nafikov R.A., Young J.W., Beitz D.C. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 2005, 85(2):165-175.
19. Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H., Sordillo L.M. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science* 2010, 93(6):2508–2516.
20. Sordillo L.M., Aitken S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009, 128(1-3):104–109.