

IN VITRO STABILNOST HORMONA U UZORCIMA KRVI KRAVA

IN VITRO STABILITY OF HORMONES IN COW BLOOD SAMPLES

**Danijel Kovačević^a, Dražen Kovačević^a, Vanja Kovačević^a, Mira Majkić^b,
Radojica Djoković^c, Marko Cincović^b**

^aVeterinarska ambulanta Kovačević, Teslić, R.Srpska, BiH

^bDepartman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Srbija

^cAgronomski fakultet Čačak, Srbija

Autor za korespondenciju: kovacevic.danijel8@gmail.com



R.Dj. <https://orcid.org/0000-0003-0900-3227>, M.C. <https://orcid.org/0000-0002-5683-8983>, M.M. <https://orcid.org/0009-0007-0110-7327>

SAŽETAK

Hormoni su veoma značajni kod krava jer učestvuju u orkestriranom prestrojavanju organizma na laktaciju koja dolazi (homeoreza) i kao takvi imaju veliki dijagnostički i prognostički značaj, pa je održavanje njihove stabilnosti u uzorku od presudne važnosti. U ovom istraživanju je učestvovalo 300 uzoraka poreklom od mlečnih krava u različitim periodima laktacija. Uzorci su podeljeni u 6 grupa: prema vremenu od uzorkovanja do obrade u laboratoriji (0-4h, 4-8 h i preko 8h) i prema prisustvu preanalitičkih faktora (grupa sa hemolizom, grupa transportovana na ambijentalnoj temperaturi i grupa sa malom zapreminom uzorka). Uzorci su ostavljani na +4°C i testirani su jednom dnevno tokom 6 dana čuvanja uzorka. Uzorci koji su stavljeni na -20°C testirani su jednom mesečno tokom 6 meseci. Maksimalno dozvoljena nestabilnost izračunata na osnovu analitičke i intraindividualne varijabilnosti kretala se od 6,2 do 6,8 % (T3, T4, STH. IGF-I i progesteron) odnosno do 7,1 do 7,2 % (za insulin i kortizol) i smatra se da je uzorak izgubio stabilnost ako se tokom veremena desi promena vrednosti parametara u procentu iznad ove maksimalno određene vrednosti. Najmanju stabilnost na +4°C pokazao je progesteron koji se može čuvati do 48h. Sledeći je bio insulin koji može biti stabilan do 3 dana u uzorku koji je opterećen preanalitičkim greškama, ali je bio stabilniji u uzorcima koji nisu bili opterećeni preanalitičkim greškama. Kortizol, T3 i T4 imaju manju stabilnost pa se mogu čuvati do 4 ili 5 dana ako je uzorak opterećen preanalitičkim greškama. Kod zamrznutih uzoraka nije nađeno značajnije opadanje stabilnosti tokom eksperimentalnog perioda. Na stabilnost endokrinoloških parametara utiču osobine hormona i postojanje preanalitičkih grešaka u epruveti.

Ključne reči: krave, endokrini parametri, maksimalno dozvoljena nestabilnost, preanalitičke greške.

ABSTRACT

Hormones are very important in cows because they participate in the orchestrated rearrangement of the organism for the coming lactation (homeoresis) and as such have great diagnostic and prognostic significance, so maintaining their stability in the sample is of crucial importance. Three hundred samples originating from dairy cows in different periods of lactation participated in this research. The samples were divided into 6 groups: according to the time from sampling to processing in the laboratory (0-4h, 4-8h and over 8h) and according to the presence of pre-analytical factors (group with hemolysis, group transported at ambient temperature and group with small sample volume). The samples were left at +4°C and were tested once a day during 6 days of sample storage. Samples that were placed at -20°C were tested once a month for 6 months. The maximum permissible instability calculated on the basis of analytical and intraindividual variability ranged from 6.2 to 6.8 % (T3, T4, STH. IGF-I and progesterone) and up to 7.1 to 7.2 % (for insulin and cortisol) and it is considered that the sample has lost its stability if during the time there is a change in the value of the parameters in a percentage above this maximum determined value. The lowest

stability at +4°C was shown by progesterone, which can be stored for up to 48 hours. Next was insulin, which can be stable for up to 3 days in a sample affected by preanalytical errors, but was more stable in samples not affected by preanalytical errors. Cortisol, T3 and T4 have less stability and can be stored for up to 4 or 5 days if the sample is loaded with pre-analytical errors. With frozen samples, no significant decrease in stability was found during the experimental period. The stability of endocrinological parameters is influenced by the properties of hormones and the existence of pre-analytical errors in the test tube.

Key words: cows, endocrine parameters, maximum permitted instability, preanalytical errors.

HORMONI KOD KRAVA I NJIHOV ZNAČAJ U HOMEOSTAZI I HOMEOREZI

Hormoni su veoma značajni kod krava jer učestvuju u orkestriranom prestrojavanju organizma na laktaciju koja dolazi (homeoreza) i kao takvi imaju veliki dijagnostički i prognostički značaj (1-3), pa je održavanje njihove stabilnosti u uzorku od presudne važnosti.

Insulin je hormon koji se sintetise u B-ćelijama endokrinog pankreasa i ima vrlo značajnu ulogu u metabolizmu organskih materija, naročito ugljenih hidrata i masti. Posebno je značajna uloga insulina u metabolizmu masti i ugljenih hidrata kod preživara za vreme povećanih metaboličkih zahteva, odnosno u periodima graviditeta i početkom laktacije. Kod krava u laktaciji dolazi do smanjivanja koncentracije insulina u krvi, zbog čega dolazi do usmeravanja prekurzora ka mlečnoj žlezdi i time njihovog većeg iskorišćavanja za sintezu sastojaka mleka. Takođe, ovi autori su utvrdili negativnu korelaciju između koncentracije insulina u krvi i proizvodnje mleka, a značajno pozitivnu sa povećanjem telesne mase. Nađeno je da u uslovima povišene insulinemije postoje sve pogodnosti da se značajan deo prekurzora usmeri za sintezu telesne masti i time umanji nivo aktivnosti mlečne žlezde u pogledu lučenja maksimalne količine mleka, a to je posledica manje osetljivosti mlečne žlezde na delovanje insulina u odnosu na masno tkivo. Utvrđena je značajnu negativnu korelaciju ($r = -0.55$) između koncentracija insulina i slobodnih masnih kiselina u puerperijumu kod krava i smatraju da snižavanje koncentracije insulina u krvi u puerperijumu omogućava prelazak organizma na masne kiseline kao glavno metaboličko gorivo. Ovaj proces je posebno značajan kod ketoznih krava kod kojih su utvrđene niže vrednosti insulina u odnosu na zdrave krave u puerperijumu i kod kojih se kao posledica toga pojačava lipomobilizacija, a velike količine masnih kiselina u jetri koriste za stvaranje ketonskih tela. Zbog toga je u krvi

ketoznih krava pored hipoinsulinemije prisutna hiperlipidemija, hipoglikemija i hiperketonemija.

Trijodtrironin (T_3) i tiroksin (T_4) su hormoni štitaste žlezde. Uloga tireoidnih hormona je veoma značajna kod visoko-mlečnih krava. Utvrđeno je da su kod krava sa visokom mlečnošću značajno niže vrednosti koncentracije trijodtironina i tiroksina u krvi u odnosu na vrednosti kod krava sa niskom mlečnošću ili kod krava u periodu zasušenja sve do teljenja. Nedovoljno unošenje energije, kao i negativni energetske bilans su usko povezani sa smanjivanjem koncentracije tiroksina u krvi, a posebno trijodtironina u peripartalnom periodu kod mlečnih krava. Niski nivoi trijodtironina i tiroksina u krvi tokom laktacije kod krava posledica smanjene aktivnosti tireoidne žlezde, posredstvom hipotalamo-hipofizne osovine uzrokovane stanjem visoke produkcije mleka. Kod mlečnih krava je utvrđeno da su koncentracije trijodtironina i tiroksina u krvi niže kod krava u laktaciji u odnosu na krave kod kojih mlečna žlezda nije aktivna. Takođe, koncentracije trijodtironina i tiroksina su stalno niže kod krava sa većom produkcijom mleka u odnosu na krave sa manjom produkcijom mleka. Razlike su bile statistički značajne i to od 40 do 305 dana laktacije. Smatra se da relativno niske koncentracije trijodtironina i tiroksina u krvi visoko-produktivnih krava, mogu biti posledica razlika u energetskom metabolizmu između visoko-produktivnih i nisko-produktivnih krava.

Kortizol je najznačajniji glukokortikosteroid kod preživara. On ima osnovnu funkciju u regulaciji metabolizma organskih materija. Kod preživara kortizol ima važnu ulogu u regulisanju procesa glukoneogeneze i deponovanju glikogena u jetri, kako kod normalno hranjenih tako i gladnih životinja. Na metabolizam masti kortizol ima pretežno kataboličku ulogu.

Hormon rasta (STH) - Pozitivna korelacija između promena u količini proizvedenog mleka i koncentracije hormona rasta u odnosu na koncentraciju insulina u krvi, ukazuje da hormon

rasta za razliku od insulina, stimuliše proces lipolize iz telesnih depoa i povećava količinu raspoloživih prekursora za produkciju mleka.

Faktor rasta sličan insulinu (IGF-I) sintetiše se u jetri pod uticajem somatotropina i ova stimulacija predstavlja temelj osovine STH - IGF-I. Period rane laktacije kod krava karakteriše dugotrajni negativni energetski bilans i za to vreme jetra postaje neosetljiva na delovanje STH, što uzrokuje izraženo smanjenje koncentracije IGF-I u cirkulaciji.

Tokom lutealne faze corpus luteum proizvodi velike količine progesterona, pa se koncentracija progesterona u plazmi povećava za dvadeset puta. Progesteron ima kratak poluživot i u jetri se konvertuje u pregnandiol, a on u glukuronsku kiselinu koja se ekskretuje urinom. Ovaj hormon inhibira oslobađanje GnRH iz hipotalamusa i posledično izlučivanje FSH i LH iz adenohipofize. Koncentracija progesterona, koja se povećava u toku lutealne faze, utiče na lučenje LH. Progesteron ispoljava antiestrogeni efekat i na miometrijalne ćelije u smislu smanjenja njihove ekscitabilnosti, senzitivnosti na oksitocin, stimulatoran efekat na nivou endometrijuma, ali tako što stimuliše sekretorne ćelije te se time obezbeđuju uslovi za nidaciju oplođene jajne ćelije. Smatra se da su estrogeni odgovorni za tzv. proliferativnu fazu u ciklusu uterusa, a progesteron za sekretornu fazu. Pored toga, progesteron povećava sekretornu aktivnost (lučenje sluzi) jajovoda, što je pored ostalog važno da obezbedi optimalnu sredinu za prolaz spermatozoida. Na nivou mlečnih žlezda progesteron stimuliše razvoj lobulusa i alveola tako što indukuje diferencijaciju već estrogenima pripremljenog duktalnog tkiva i potpomaže funkciju mlečnih žlezda tokom laktacije. Merjenje koncentracije progesterona (P4) je do sada najviše korišćeni metod otkrivanja graviditeta kod domaćih životinja. Iako nije specifičan samo za graviditet, progesteron se može koristiti kao test hormon na graviditet jer žuto telo opstaje tokom ranog graviditeta kod svih domaćih životinja.

PREANALITIČKE GREŠKE I STABILNOST UZORAKA

Najveći broj informacija tokom dijagnostičkog odlučivanja veterinari dobijaju kroz laboratorijske rezultate, a potom kroz kliničku sliku. Zbog toga je laboratorijsko testiranje od velikog značaja. Preatalitička faza rada je najveći izvor

grešaka i čini oko 70% svih grešaka u laboratoriji (4-9). Faktori koji deluju u ovoj fazi mogu na najrazličitije načine da promene vrednosti laboratorijskih parametara koji se mere, što može dovesti do pogrešne interpretacije dobijenih rezultata, što u krajnjoj liniji može ugroziti i život životinje, odnosno tehnološke procedure na farmi. Preatalitički faktori se mogu kategorisati kao tehnički faktori (koji se odnose na način uzorkovanja i organizacijom postupanja sa uzorcima pre same analize, izbor antikoagulanasa, skladištenje, transport i čuvanje uzoraka i očuvanje stabilnosti uzorka do analize) i kao biološki faktori (koji se odnose na svojstva jedinke). Potrebno je u svakoj laboratoriji i za svaku vrstu dobro poznavati tehničke preanalitičke faktore i izvršiti njihovo identifikovanje, kvantifikovanje i kontrolu pomoću stalnih standardnih procedura laboratorije. Biološki faktori čine mnogo šire polje koje se tiče različitih osobina jedinki kao što su starost, zdravstveni status, gladovanje, stres, sedacija, telesna kondicija, reproduktivni status i dr., koji su teži za kontrolu, ali je bitno da budu kvalitetno dokumentovani i uzeti u obzir prilikom interpretacije laboratorijskih rezultata. U uslovima rada sa farmским životinjama, dešava se da ovaj deo preanalitičke faze nije pod kontrolom stručnjaka iz laboratorije, već zavisi od obaveštenosti i obučenosti veterinara sa terena koji šalje uzorke na ispitivanje. Zbog toga je bitno da farmски veterinari budu obučeni za razumevanje kako tehničkih tako i bioloških preanalitičkih faktora, je rod njih u najvećoj meri zavisi adekvatnost uzorka, njegovog transporta kao i dostupnost podataka o jedinki za koju vršimo određivanje metaboličkog profila.

Preatalitički faktori u velikoj meri mogu uticati na vrednosti i stabilnost analiza u krvi. Prolongirani kontakt seruma sa ćelijskim komponentama i koagulumom smanjuje stabilnost analiza, ali se serum smatra stabilnijim uzorkom u odnosu na plazmu. Upotreba različitih vakutajnera i antikoagulanasa može dovesti do znatnog odstupanja u vrednosti metabolita u plazmi kod mlečnih krava u odnosu na serum (10). Dugotrajno čuvanje uzorka na -20°C daje prihvatljive rezultate tokom 90 dana, dok se prolongirana stabilnost analiza postiže prilikom čuvanja na -70°C (11). Ispitivanja pokazuju da preanalitički i postanalitički faktori (vreme transporta uzorka i temperatura čuvanja uzoraka) mogu imati značajan uticaj na varijabilnost parametara u analitičkoj fazi (12). Hemoliza smanjuje stabilnost vitamina, hormona i lekova u

krvi, a u našem istraživanju se pokazalo da je veliki broj analita manje stabilan u hemoliziranim uzorcima (13,14). Nedovoljno punjenje uzorka dovodi do razvoja hemolize i promene u vrednosti metabolita (15). Nedovoljno punjenje nastaje kao posledica loše venepunkcije, slabog vakuma u tubi, ili kao posledica otvaranja vakum tube, što često dovodi mešanja sa vazduhom, kada dolazi do razvoja pene u uzorku, mehaničkog oštećenja uzorka, hemolize i uticaja na analite (16). Pored hemolize u ovakvim uzorcima može biti problem sa izmenjenom turbidimetrijom, verovatno zbog incomplete clot formation i postojanja latent fibrin formation (17). Ostavljanje uzorka na ambijentalnoj temperaturi, posle čega se odlazi na +4°C dovodi do značajnog variranja analita u odnosu na proceduru u kojoj se uzorci odmah stavljaju na +4°C (18), sa čime se slažu naši rezultati.

Utvrđen je nivo uticaja preanalitičkih grešaka na stabilnost velikog broja parametara kod životinja i ljudi (19-28). Koncentracija NEFA na +4°C je bila očuvana samo kod brzog transporta uzorka u laboratoriju, dok prolongirani transport i prisustvo preanalitičkih faktora značajno smanjio stabilnost NEFA na 1-3 dana (24-48h). NEFA je bila stabilna na -20°C tokom celog ispitivanog perioda. Naši rezultati se slažu sa Stokol and Naydan (2005) (29) koji su pokazali da NEFA concentrations were stable at 4°C for 72 h in separated plasma or serum i znatno veću stabilnost na -20°C. BHB je pokazao stabilnost u svim uslovima ispitivanja i svim vremenskim tačkama, što se takođe slaže sa predhodno citiranim autorima. Porast koncentracije NEFA tokom vremena na +4°C nađen je i kod ovaca i ljudi (30,31). Koncentracija Ca je bila stabilna bez obzira na delovanje preanalitičkih faktora, način čuvanja i time-point. Slične rezultate su dobili Bach i sar. (2021) (32). Zbog degradacije uzoraka dolazi do opadanja koncentracije analita tokom vremena. Potencijalni klinički značaj je utvrđen u određenom procentu uzoraka za TBIL, AST, NEFA, BHB i Ca. Potencijalni klinički značaj je potvrđen za TBIL u predhodnom testu stabilnosti (33). Utvrđene su granične vrednosti ovih parametara koje sa visokom specifičnošću i senzitivnošću ukazuju na različite bolesti ili lošu metaboličku adaptaciju (34-36), pa je potrebno razmotriti da li odstupanja vrednosti analita tokom testa stabilnosti može dovesti do pogrešne interpretacije u određenoj vremenskoj tački.

Standardne smernice za rukovanje uzorcima krvi navode da bi plazmu ili serum trebalo odvojiti od ćelija što je pre moguće, a svakako u roku od 2

sata. Iako je to potrebno za određene analite, može se pretpostaviti da se mnogi krvni testovi pogoršaju u roku od nekoliko sati nerazdvojeni uzorci čuvaju se na temperaturi okoline. Ova uočena potreba za trenutnim lokalnim odvajanjem uzoraka krvi ili njihovim brzim hladnim prenosom u centralnu laboratoriju, što povećava složenost i troškove, može spriječiti uključivanje prikupljanja krvi u opsežne epidemiološke studije. Posebno kada se uzorci krvi prikupljaju na velikom broju zasebnih lokacija u okviru studije, slanje uzoraka pune krvi u centralnu laboratoriju za odvajanje može biti prikladnije i isplativije od dogovaranja za lokalno odvajanje ili za kurirski transport ohlađenih uzoraka (37-45).

ISPITIVANJE STABILNOSTI HORMONA

U ovom istraživanju je učestvovalo 300 uzoraka poreklom od mlečnih krava u različitim periodima laktacija. Uzorci su podeljeni u 6 grupa: prema vremenu od uzorkovanja do obrade u laboratoriji (0-4h, 4-8 h i preko 8h) i prema prisustvu preanalitičkih faktora (grupa sa hemolizom, grupa transportovana na ambijentalnoj temperaturi i grupa sa malom zapreminom uzorka). Uzorci krvi su uzimani iz *v.coccigea* u adekvatnim tubama. Posle centrifugovanja, količina seruma je bila 5-6 mL, osim u uzorcima male zapremine koji su se kretali oko 2-3 mL.

Uzorci su ostavljani na +4°C i testirani su jednom dnevno tokom 6 dana čuvanja uzorka. Uzorci koji su stavljeni na -20°C testirani su jednom mesečno tokom 6 meseci. Gómez-Rioja i sar. (2019) (46) u svom protokolu precizno su definisali tehničke procedure za merenje stabilnosti. Gubitak stabilnosti se procenjuje poređenjem mernih vrednosti dva uzorka dobijena od istog pacijenta i analizirana u različitim vremenskim tačkama – bazalno vreme/uzorak i vreme ispitivanja/uzorak. Razlike su izražene procentualnom devijacijom (PD%). PD% je razlika između izmerenih koncentracija u optimalnim uslovima (osnovni uzorak; t₀, prosek ponovljenih merenja) i njegovih koncentracija kada se skladište za maksimalno dozvoljeno vreme skladištenja (uzorak za testiranje; tk prosek ponovljenih merenja). Razlika se pretvara u %PD od osnovne vrednosti: $PD\% = ((tk - t_0) / t_0) \times 100$. MPI je izračunat $MPI = 0,5 \times (CV_a + CV_i)$. PD% < MPI za sve ispitanike ukazuje na to da nije došlo do značajnog gubitka stabilnosti unutar proučenog vremena skladištenja. PD% ≥ MPI kod nekih ispitanika ukazuje na to da je došlo do

značajnog gubitka stabilnosti unutar proučenog vremena skladištenja. Ispitana je i stabilnost endokrinoloških parametara u funkciji postojanja preanalitičkih faktora. U prvom koraku je određen maksimalno dozvoljeni nivo nestabilnosti na osnovu predhodno dobijenih varijabilnosti u Laboratoriji za patološku fiziologiju. Vrednosti MPI za odabrane hormone prikazani su u tabeli 1. U grafikonima je prikazana je dinamika promene vrednosti endokrinoloških parametara na temperaturi frižidera i zamrzavanja.

Kada se radi o hormonima najveću osetljivost prema hemolizi je pokazao INS. Značajno opadanje njegove vrednosti je posledica toga što se tokom hemolize iz eritrocita oslobađaju protease koje uništavaju peptidne hormone kao što je INS (47). T3, T4 and CORT pokazuju nižu koncentraciju prilikom dodavanja hemoliziranog uzorka, ali je potrebno da postoji veoma visok nivo hemolize da bi došlo do biasa koji prevazilazi analitički odnosno klinički dozvoljenu varijabilnost ovih hormona. CORT i T4 su hormoni vezani za proteine u krvotoku, pa tačno merenje ovih hormona pre svega zavisi od sposobnosti eseja da molekule hormona odvoji od binding proteina (48). Naše metode podrazumevaju hemiluminiscentni način merenja hormona kod kojih a hemoliza ne pokazuje spektrofotometrijsku interferenciju (49), što potvrđuje da je postojao dominantan uticaj hemijske interferencije na koncentraciju hormona preko proteaza koje degradiraju hormone, antitela i druge proteinske sisteme značajne za tačno određivanje hormona u nekom eseju.

Postoje različiti indeksi koji se koriste za određivanje stabilnosti uzorka. Najčešće se koriste sledeći (izrazi su dati na engleskom jeziku zbog sledljivosti): critical change value (CCV), the maximum permissible instability (MPI) and the total allowable error (TEa). MPI je mnogo striktniji kriterijum, jer dovodi do odbacivanja većeg broja analiza u određenoj vremenskoj tački u odnosu na CCV, koji znatno veći broj analiza čini prihvatljivim (50).

Prolongirani transport u idealnim uslovima ili postojanje preanalitičkih faktora kao što su neadekvatan transport na sobnoj temperaturi, hemoliza ili mala zapremina uzorka skraćuju stabilnost uzoraka u oba temperaturna režima. Ova studija može pomoći u definisanju prihvatljivog vremena transporta i čuvanja za uzorke krvi goveda, što je od velikog značaja, jer u radu sa farmским životinjama često nije moguće u kratkom roku uzeti

uzorke i dopremiti ih u laboratoriju, a uzorci su često opterećeni određenim preanalitičkim faktorima uz ograničene mogućnosti ponavljanja uzorkovanja. Smanjenje vremena transporta od farme do laboratorije je ključna stvar, jer prolongirani transport u kombinaciji sa postojanjem drugih preanalitičkih faktora u mnogome smanjuje stabilnost uzoraka, pa je potrebno što ranije izvršiti analize. Stabilnost krvnih parametara i interferencija sa preanalitičkim faktorima pokazuje određene specifičnosti za vrstu, pa se ne mogu u potpunosti preuzeti parametri stabilnosti koji su određeni zadrage vrste životinja ili ljudi, što potvrđuje značaj izvedenog istraživanja na mlečnim kravama. U našim ranijim istraživanjima potvrdili smo značaj preanalitičkih faktora u oceni stabilnosti biohemijskih parametara krvi kod krava (51), pa zaključujemo da poznavanje stabilnosti i dinamičke promene metabolita i hormona tokom vremena može značajno da utiče bias ovih parametara, a posledično i na interpretaciju rezultata, pa je potrebno poznavati stabilnost tokom izrade endokrinog i metaboličkog profila u rutinskoj praksi.

Tabela 1. Maksimalno dozvoljena nestabilnost (MPI) endokrinoloških parametara u krvi krava

Biohemijski parametar	Maksimalno dozvoljena nestabilnost (MPI)
INS	7,1
CORT	7,2
T3	6,1
T4	6,3
IGF-I	6,2
STH	6,8
PROG	6,4

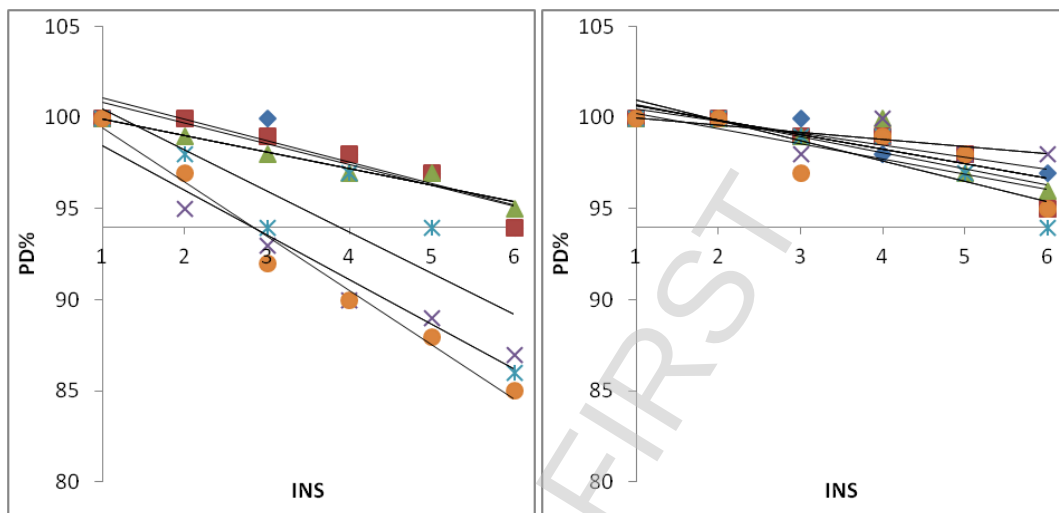
Legenda:

- ◆ Kontrolisani transport 0-2h
- Kontrolisani transport 2-4h
- ▲ Kontrolisani transport 4-8h
- × Hemoliza
- ✱ Mala zapremina krvi u vakutajneru
- Transport na sobnoj temperaturi

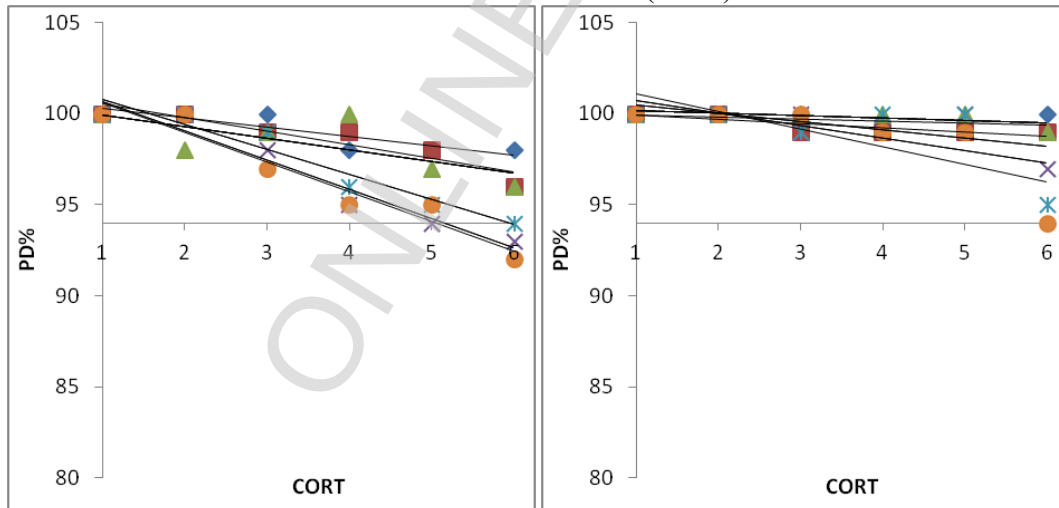
Maksimalno dozvoljena nestabilnost izračunata na osnovu analitičke i intraindividualne varijabilnosti kretala se od 6,2 do 6,8 % (T3, T4, STH, IGF-I i progesteron) odnosno do 7,1 do 7,2 % (za insulin i kortizol) i smatra se da je uzorak

izgubio stabilnost ako se tokom vremena desi promena vrednosti parametara u procentu iznad ove maksimalno određene vrednosti. Najmanju stabilnost na +4°C pokazao je progesteron koji se može čuvati do 48h. Sledeći je bio insulin koji može biti stabilan do 3 dana u uzorku koji je opterećen preanalitičkim greškama, ali je bio stabilniji u

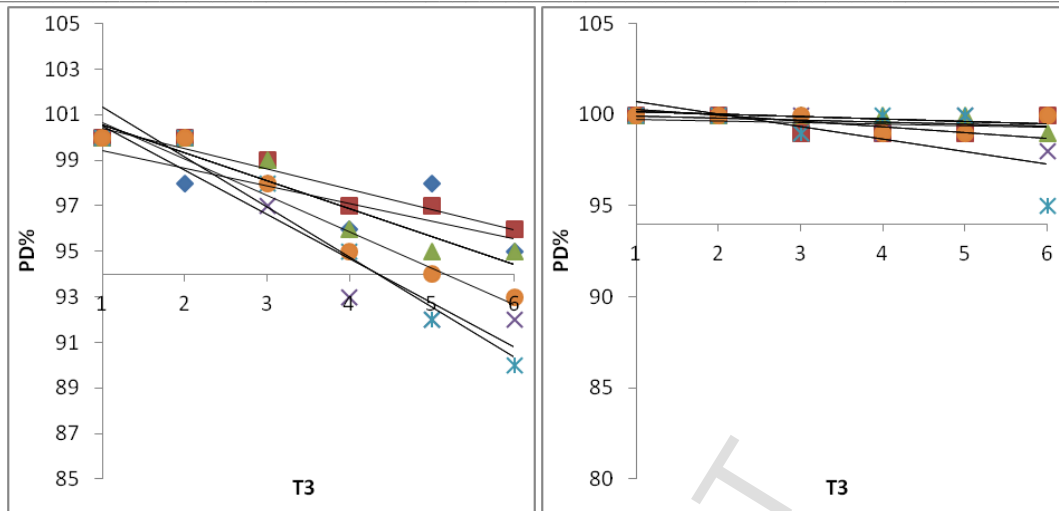
uzorcima koji nisu bili opterećeni preanalitičkim greškama. Kortizol, T3 i T4 imaju manju stabilnost pa se mogu čuvati do 4 ili 5 dana ako je uzorak opterećen preanalitičkim greškama. Kod zamrznutih uzoraka nije nađeno značajnije opadanje stabilnosti tokom eksperimentalnog perioda.



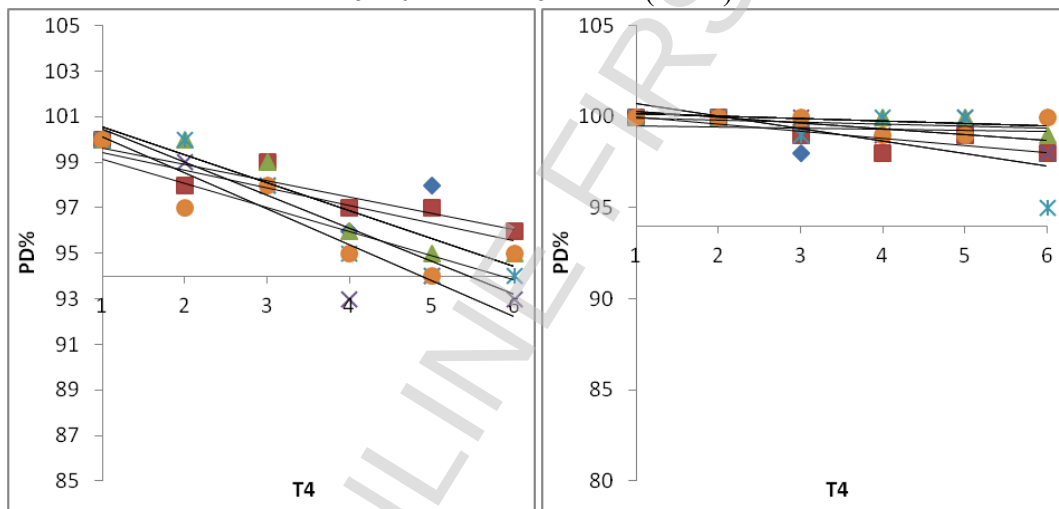
Grafikon 50 i 51: Stabilnost insulina (INS) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)



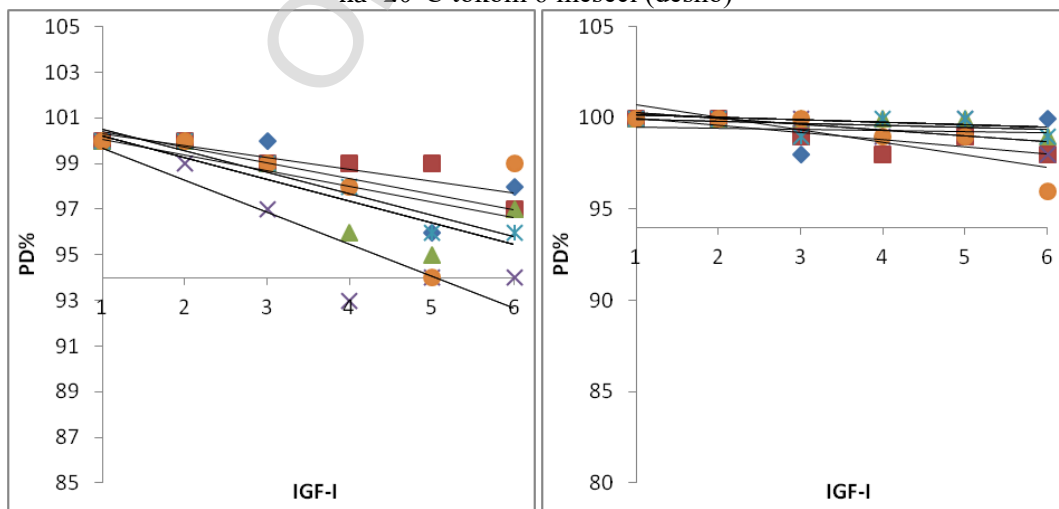
Grafikon 52 i 53: Stabilnost kortizola (CORT) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)



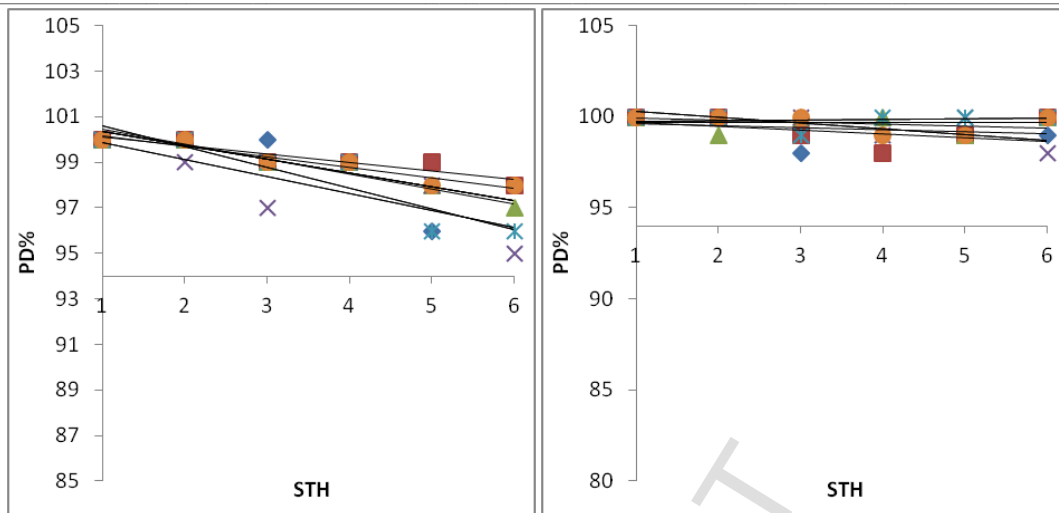
Grafikon 54 i 55: Stabilnost trijodotironina (T3) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)



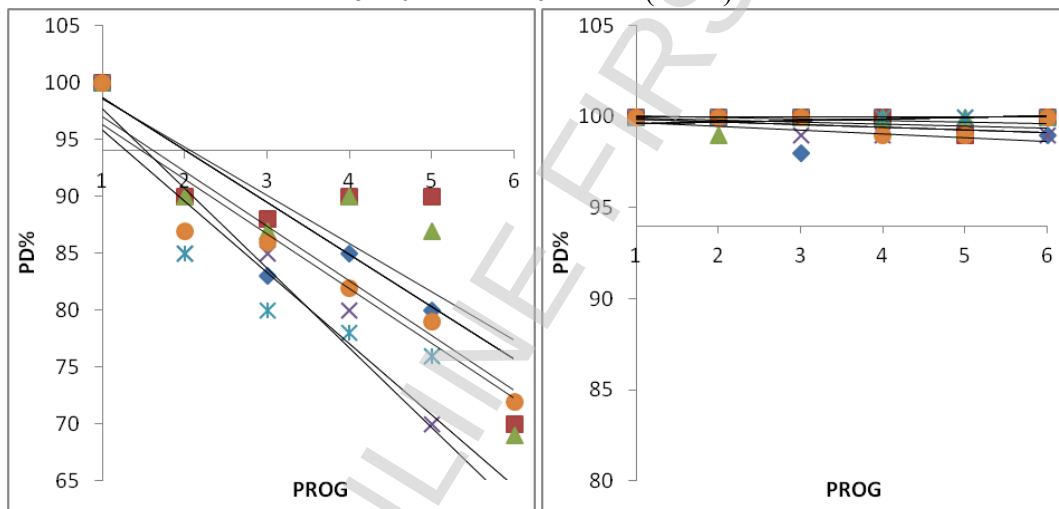
Grafikon 56 i 57: Stabilnost tiroksina (T4) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)



Grafikon 58 i 59: Stabilnost insulin sličnog faktora rasta I (IGF-I) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)



Grafikon 60 i 61: Stabilnost hormona rasta (STH) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)



Grafikon 62 i 63: Stabilnost progesterona (PROG) na +4°C tokom 6 dana(levo) i na -20°C tokom 6 meseci (desno)

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was created as a result of research within the "Agreement on the transfer of funds for the financing of scientific research work of teaching staff at accredited Higher Education Institutions in 2024, contract registration number: 451-03-65/2024-03/ 200117".

LITERATURA

1. Cincović M. *Metabolički stres krava. Monografija. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu*, 2016.
2. Belić B., Cincović M.R. *Referentne vrednosti laboratorijskih parametara u krvi životinja. Monografija. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu*, 2020.
3. Đoković R.D.: *Endokrini status mlečnih krava u peripartalnom periodu. Agronomski fakultet, Čačak*, 2010.
4. Lippi G., Simundic A. *Total quality in laboratory diagnostics. It's time to think outside the box. Biochemia Medica* 2010, 20, 1, 5-8.
5. Lippi G., Bonelli P., Rossi Rossana, Bardi M., Aloe R., Galeffi A., Bonilauri E. *Development of a preanalytical errors recording software. Biochemia Medica* 2010, 20, 1, 90-95.

6. Braun J., Bourges-Abella N., Geffre A., Concordet D., Trumel C. The preanalytic phase in veterinary clinic pathology. *Vet Clin Pathol* 2015, 44, 1, 8-25.
7. Guder WG. History of the preanalytical phase: a personal view. *Biochemia Medica* 2014, 24, 1, 25-30.
8. Bowen R.A.R. Hortin G.L., Csako G., Otanez O.H., Ramaley A.T. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clinical Biochemistry* 2010, 43, 4-25.
9. Humann-Ziehank E., Ganter M. Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics. *Animal* 2012, 6, 7.
10. Belić B., Cincović M.R., Došenović M., Stojanović D., Kovačević Z. The effects of different anticoagulants on biochemical parameters in blood of dairy cows. *Veterinarski glasnik* 2015, 69, 13-20.
11. Cray C., Rodriguez M., Zaias J., Altman N.H. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2009, 48, 202–204.
12. Rasalkar K., Suma H.R. The impact of preanalytical variable like delay in sample transportation and post analytical variable like deep freezer temperature on combined Measurement Uncertainty. *International Journal of Medical Science and Clinical Inventions* 2017, 4, 3034-3036.
13. Bérubé E.R., Taillon M.P., Furtado M., Garofolo F. Impact of sample hemolysis on drug stability in regulated bioanalysis. *Bioanalysis* 2011, 3, 2097-2105.
14. Hooser S.B., McCarthy J.M., Wilson C.R., Harms J.L., Stevenson G., Everson R.J. Effects of storage conditions and hemolysis on vitamin E concentrations in porcine serum and liver. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2000, 12, 365-368.
15. Neuwinger N., Zum Büschenfelde D.M., Tauber R., Kappert K. Underfilling of vacuum blood collection tubes leads to increased lactate dehydrogenase activity in serum and heparin plasma samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2020, 58, 213-221.
16. Mullins G.R., Bruns D.E. Air bubbles and hemolysis of blood samples during transport by pneumatic tube systems. *Clinica Chimica Acta* 2017, 473, 9-13.
17. Magee L.S. Preanalytical variables in the chemistry laboratory. In *Lab notes*. Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 2005.
18. Kift R.L., Byrne C., Liversidge R., Babbington F., Knox C., Binns J., Barth J.H. The effect of storage conditions on sample stability in the routine clinical laboratory. *Annals of clinical biochemistry* 2015, 52, 675-679.
19. Rioja, R. G., Espartosa, D. M., Segovia, M., Ibarz, M., Llopis, M. A., Bauça, J. M., Marzana I., Barba N., Ventura M., del Pino I.G., Puente J.J., Caballero A., Gómez C., Álvarez A.G., Alsina M.J., Álvarez V. Laboratory sample stability. Is it possible to define a consensus stability function? An example of five blood magnitudes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2018, 56, 1806-1818.
20. Clark S., Youngman L.D., Palmer A., Parish S., Peto R., Collins R. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies. *International journal of epidemiology* 2003, 32, 125-130.
21. Oddoze C., Lombard E., Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical biochemistry* 2012, 45, 464-469.
22. Taylor E.C., Sethi B. Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. *British journal of biomedical science* 2011, 68, 147-157.
23. Tanner M., Kent N., Smith B., Fletcher S., Lewer M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Annals of clinical biochemistry* 2008, 45, 375-379.
24. Donnelly J.G., Soldin S.J., Nealon D.A., Hicks J.M. Stability of twenty-five analytes in human serum at 22 degrees C, 4 degrees C, and -20 degrees C. *Pediatr Pathol Lab Med* 1995, 15, 869-874.
25. Jones D.G. Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood. *Res Vet Sci*. 1985a, 38, 3, 301-306.
26. Jones D.G. Stability and storage characteristics of enzymes in sheep blood. *Res Vet Sci*. 1985b, 38, 3, 307-311.
27. Ehsani A., Afshari A., Bahadori H., Mohri M., Seifi H.A. Serum constituents analyses in dairy cows: Effects of duration and temperature of the storage of clotted blood. *Research in veterinary science* 2008, 85, 473-475.
28. Moe M.O., Okstad W., Berland S., Framstad T. Effects of storage duration and temperature conditions on biochemical analytes in porcine clotted, uncentrifuged blood samples. *J Dairy Vet Anim Res* 2018, 7, 00181.
29. Stokol T., Nydam D.V. Effect of anticoagulant and storage conditions on bovine nonesterified fatty acid and β -hydroxybutyrate concentrations in blood. *J Dairy Sci* 2005, 88, 3139-3144.
30. Menéndez L.G., Fernández A.L., Enguix A., Ciriza C., Amador J. Effect of storage of plasma and serum on enzymatic determination of non-esterified fatty acids. *Annals of clinical biochemistry* 2001, 38, 252-255.
31. Morris J.D., Fernandez J.M., Chapa A.M., Gentry L.R., Thorn K.E., Weick T.M. Effects of sample handling, processing, storage and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. *Small Rumin. Res* 2002, 43, 157–166.

32. Bach K.D., Neves R.C., Stokol T., McArt J.A.A. Effect of storage time and temperature on total calcium concentrations in bovine blood. *J Dairy Sci* 2020, 103, 922-928.
33. Flores C.F.Y., Pineda Á.D.L.M.H., Bonilla V.M.C., Sáenz-Flor K. Sample management: stability of plasma and serum on different storage conditions. *EJIFCC* 2020, 31, 46.
34. Cincović M., Belić B., Radojičić B., Hristov S., Đoković R. Influence of lipolysis and ketogenesis to metabolic and hematological parameters in dairy cows during periparturient period. *Acta veterinaria* 2012, 62, 429-444.
35. Delić B., Belić B., Cincović M.R., Djoković R., Lakić I. Metabolic adaptation in first week after calving and early prediction of ketosis type I and II in dairy cows. *Large Animal Review* 2020, 26, 2, 51-55.
36. Djoković R., Kurćubić V., Ilić Z., Cincović M., Lalović M., Jašović B., Bojkovski, J. Correlation between blood biochemical metabolites milk yield, dry matter intake and energy balance in dairy cows during early and mid lactation. *Advances in Diabetes and Metabolism* 2017, 5, 2, 26-30.
37. Young D.S., Bermes E.W. Specimen collection and processing: sources of biological variation. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 42–72, 1999.
38. O'Connell T., Thornton L., O'Flanagan D. et al. Oral fluid collection by post for viral antibody testing. *Int J Epidemiol* 2001, 30, 298–301.
39. Perneger T.V., Etter J.F. Commentary: Extending the boundaries of data collection by mail. *Int J Epidemiol* 2001, 30, 301–302.
40. Ono T., Kitaguchi K., Takehara M., Shiiba M., Hayami K. Serumconstituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clin Chem* 1981, 27, 35–38.
41. Hankinson S.E., London S.J., Chute C.G. et al. Effect of transport conditions on the stability of biochemical markers in blood. *Clin Chem* 1989, 35, 2313–2316.
42. Heins M., Heil W., Withold W. Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995, 33, 231–238.
43. Youngman L.D., Lyon V.E., Collins R. et al. Problems with mailed whole blood in large-scale epidemiological studies and methods of correction. *The FASEB Journal* 1993, 1, 377.
44. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986, 24, 127–139.
45. Frank J.J., Bermes E.W., Bickel M.J. et al. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem* 1978, 24, 1966–1970.
46. Gómez-Rioja R., Amaro M.S., Diaz-Garzón J., Bauçà J.M., Espartosa D.M., Fernández-Calle P. A protocol for testing the stability of biochemical analytes. Technical document. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2019, 57, 12, 1829-1836.
47. Lippi, G.; Blanckaert, N.; Bonini, P.; Green, S.; Kitchen, S.; Palicka, V.; Vassault, A.J.; Plebani, M. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2008, 46, 764–772.
48. Ward, G.; Simpson, A.; Boscato, L.; Hickman, P.E. The investigation of interferences in immunoassay. *Clinical biochemistry* 2017, 50, 18, 1306-1311.
49. Simundic, A. M.; Baird, G.; Cadamuro, J.; Costelloe, S. J.; Lippi, G. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2020, 57(1), 1-21.
50. van Balveren J.A., Huijskens M.J., Gemen E.F., Péquériau N.C., Kusters R. Effects of time and temperature on 48 routine chemistry, haematology and coagulation analytes in whole blood samples. *Annals of clinical biochemistry* 2017, 54, 448-462.
51. Kovačević, D., Cincović, M., Belić, B., Đoković, R., & Majkić, M. (2021). Blood serum stability limit and maximum storage time of bovine samples. *Acta Scientiae Veterinariae*, 49.