



Uticaj hemolize uzorka na indekse insulinske rezistencije krava

Marko Cincović^a, Nikolina Milošević^a, Mira Majkić^a, Jovan Spasojević^a, Nada Plavša^a

^aUniverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

*Autor za kontakt: mcincovic@gmail.com

SAŽETAK

Insulinska rezistencija se karakteriše smanjenim odgovorom insulina na glukozu tj. smanjenom funkcijom beta ćelija pankreasa (eng., insulin hyporesponsiveness) i/ili smanjenim odgovorom glukoze na insulin tj. smanjenim ulaskom glukoze u tkivo pod dejstvom insulina (eng., insulin sensitivity). Kod mlečnih krava, poređenje energetskeg statusa i regulacije glukoze postaje sve važnije zbog sve veće potražnje za proizvodnjom mleka visokog kvaliteta i optimalnog zdravlja životinja. U tom kontekstu, indeksi insulinske rezistencije kao što su HOMA (Homeostatic Model Assessment), QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), RQUICKI (Revised QUICKI uz dodatak neesterifikovanih masnih kiselina, NEFA) i RQUICKI-BHB (RQUICKI uz dodatak β-hidroksibutirata, BHB) nude jednostavan, ali pouzdan način za kvantifikaciju insulinske osetljivosti. Indeksi insulinske rezistencije određuju su pomoću specifičnih formula koje sadrže vrednosti glukoze, insulina, NEFA i BHB. Ovi parametri su pod značajnim uticajem hemolize uzorka, koja može dovesti do značajnog biasa vrednosti navedenih parametara. Cilj ovog rada je da se utvrdi koji je to nivo hemolize uzorka koji će dovesti do takve izmene vrednosti ovih parametara da se vrednost indeksa insulinske rezistencije nađe iznad prihvatljivog praga varijabilnosti od 10%. Rezultati pokazuju da su indeksi insulinske rezistencije nelinearno povezani sa slobodnim hemoglobinom (Hb). Indeksi insulinske rezistencije su osetljivi na hemolizu, a redosled osetljivosti od najosetljivijeg ka najmanje osetljivom je: HOMA-IR > QUICKI > RQUICKI-BHB > RQUICKI, pri čemu se razlike u osetljivosti direktno objašnjavaju njihovom matematičkom strukturom i načinom kombinovanja korigovanih parametara. HOMA-IR prelazi prag uobičajene varijabilnosti od 10% pri vrlo niskim koncentracijama slobodnog hemoglobina od 1,1 g/L, QUICKI i RQUICKI-BHB će postati nestabilni u rasponu od 3,2-4,2 g/L, dok će RQUICKI ostati stabilan i pri izraženoj hemolizi 7-8 g/L. Viša hemoliza od navedene zahteva odbacivanje uzorka. Izveštavanje o koncentraciji slobodnog hemoglobina i vizuelne procene hemolize uzorka u eksperimentima gde se koriste indeksi insulinske rezistencije kod krava je neophodan.

Ključne reči:

Insulinska senzitivnost, slobodni hemoglobin, krave, menadžment uzorka

Uvod

Insulinska rezistencija predstavlja stanje u kome je smanjen biološki efekat insulina, kada kompenzatorno može doći do povećanja njegove koncentracije (Zhao, 2023). Insulinska rezistencija se karakteriše smanjenim odgovorom insulina na glukozu tj. smanjenom funkcijom beta ćelija pankreasa (eng., *insulin hyporesponsiveness*) i/ili smanjenim odgovorom glukoze na insulin tj. smanjenim ulaskom glukoze u tkivo pod dejstvom insulina (eng., *insulin sensitivity*) (Lee et al., 2022; James et al., 2021). Sa aspekta receptora insulinska rezistencija može biti prerceptorska (smanjena sekrecija i/ili povećana degradacija insulina), receptorska (smanjen broj receptora i/ili smanjen njihov afinitet za vezivanje insulina) i postreceptorska (defekt u ćelijskoj signalizaciji i translokaciji transportera za glukozu) (Hayirli, 2006). Rezistencija na insulin u peripartalnom periodu je neophodna kako bi vime, kao organ u kom upotreba glukoze nije zavisna od insulina, dobilo dovoljno hranljivih materija i energije za započinjanje laktacije (Qiao et al., 2024).

Kod mlečnih krava, poređenje energetskeg statusa i regulacije glukoze postaje sve važnije zbog sve veće potražnje za proizvodnjom mleka visokog kvaliteta i optimalnog zdravlja životinja (Cincović et al., 2017; Cincović et al., 2025), kao i zbog efekta teljena, laktacije i telesnih osobina (Cincović i sar., 2019; Došenović-Marinković i sar., 2022). U tom kontekstu, indeksi insulinske rezistencije (IR) – HOMA (Homeostatic Model Assessment), QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), RQUICKI (Revised QUICKI sa dodatim vrednostima neesterifikovanih masnih kiselina, NEFA) i RQUICKI-BHB (RQUICKI uz dodatak β-hidroksibutirata, BHB) – nude jednostavan, ali pouzdan način za kvantifikaciju insulinske osetljivosti u farma-uslovima, a istovremeno omogućavaju korelaciju sa laboratorijskim „zlatnim standardom“ – hiperinsulinemičkim euglikemijskim klampom (HIEC) i intravenoznim testom tolerancije glukoze (IVGTT). HOMA se izračunava kao (insulin

($\mu\text{U mL}^{-1}$) \times glukoza (mmol L^{-1})/22,5. Ovaj parametar pretpostavlja stabilnu, post-absorpcionu fazu metabolizma i daje vrednost koja korelira sa bazalnom insulinskom sekrecijom i glukoznom koncentracijom. Veće vrednosti HOMA-IR ukazuju na povećanu rezistenciju, što se kod krava najčešće viđa u fazi intenzivne laktacije kada je potreban veći unos energije. QUICKI je definisan kao $1/[\log(\text{insulin}) + \log(\text{glukoza})]$, a njegov revidirani RQUICKI izračunava se kao $1/[\log(\text{insulin}) + \log(\text{glukoza}) + \log(\text{NEFA})]$. Ovi indeksi su osetljiviji na promene u niskim rasponima insulina i glukoze, pa se koriste kod krava koje se nalaze u ranim stadijumima laktacije ili kod retkih slučajeva hipoglikemije. RQUICKI-BHB proširuje RQUICKI uvođenjem koncentracije β -hidroksibutirata (BHB) u formulu: $\text{RQUICKI-BHB} = 1/[\log(\text{insulin}) + \log(\text{glukoza}) + \log(\text{NEFA}) + \log(\text{BHB})]$. Ovde BHB reflektuje ketogenezu i energetski deficit; njegova integracija omogućava diferencijaciju između „čiste“ insulinske rezistencije i rezistencije koja je sekundarna zbog negativnog energetskog balansa (npr. kod podhranjenosti ili peripartalnog perioda). Ovi indeksi su definisani u većem broju naučnih radova (Holtenisu and Holtenisu, 2007; DeKoster and Opsomer, 2013; Cincović et al., 2018; Hasegawa et al., 2019).

Indeksi insulinske rezistencije određuju su pomoću specifičnih formula koje sadrže vrednosti glukoze, insulina, NEFA i BHB. Ovi parametri su pod značajnim uticajem hemolize uzorka (Kovačević et al., 2024), koja može dovesti do značajnog biasa i odstupanja vrednosti navedenih parametara u toj meri da dovode do povećane varijabilnosti i manje pouzdanosti indeksa insulinske rezistencije. Stabilnost uzoraka i stalna kontrola preanalitičkih faktora je ključna za tumačenje laboratorijskih rezultata, a mnogi preanalitički faktori mogu igrati presudan uticaj na koncentraciju parametara značajnih za izračunavanje indeksa insulinske rezistencije (Krnjaić i sar., 2024; Fajin i sar., 2025; Marković i sar., 2025). Cilj ovog rada je da se utvrdi koji je to nivo hemolize uzorka koji će dovesti do takve izmene vrednosti ovih parametara da se vrednost indeksa insulinske rezistencije nađe izvan prihvatljivih okvira varijabilnosti.

Materijal i metode

Ogled je izvršen na 50 krava Holštajn-frizijske rase u drugoj i trećoj laktaciji, sa proizvodnjom mleka na nivou 7500 litara u prethodnoj standardnoj laktaciji. Krave su hranjene potpuno mešanim obrokom kojim se zadovoljavaju kompletne potrebe krava, a voda im je davana ad libitum. Krave su hranjene TMR obrokom standardnog hemijskog sastava prema preporukama (NRC, 2001).

Krv je uzimana u različitim periodima laktacije venepunkcijom repne vene (*v.coccigea*) u heparinske vakutajnere. Od svake krave su uzete dve epruvete sa po 10 mL krvi. Krv je brzo po uzorkovanju transportovana u Laboratoriju za patološku fiziologiju gde je vršeno laboratorijsko merenje.

Test interferencije urađen je prema međunarodnim standardima (Simundić et al., 2020; Uçar et al., 2022). Jedna od uparenih epruveta je centrifugirana radi dobijanja uzoraka bez hemolize. Krv iz druge epruvete je pomoću šprica propuštena kroz iglu 10 puta kako bi se postigla mehanička hemoliza. Epruvete su centrifugirane na $2000\times g$ u trajanju od 10 minuta, u skladu sa preporukama proizvođača. U jednoj epruveti koncentracija slobodnog Hb iznosila je 0, dok je u drugoj koncentracija slobodnog Hb bila $>10 \text{ g/L}$ (što je provereno spektrofotometrijski). Uzorci sa i bez hemolize su zatim razblaživani tako da su za svaku kravu dobijeni uzorci sa koncentracijom slobodnog Hb od 10 g/L. Potom su uzorci sa 10 g/L slobodnog Hb mešani sa uzorcima sa 0 g/L radi dobijanja uzoraka sa koncentracijama slobodnog Hb od 8, 6, 4, 2, 1 i 0 g/L. Hemolizovani uzorci su za svaku od životinja razblaživani nehemolizovanim uzorcima iste životinje.

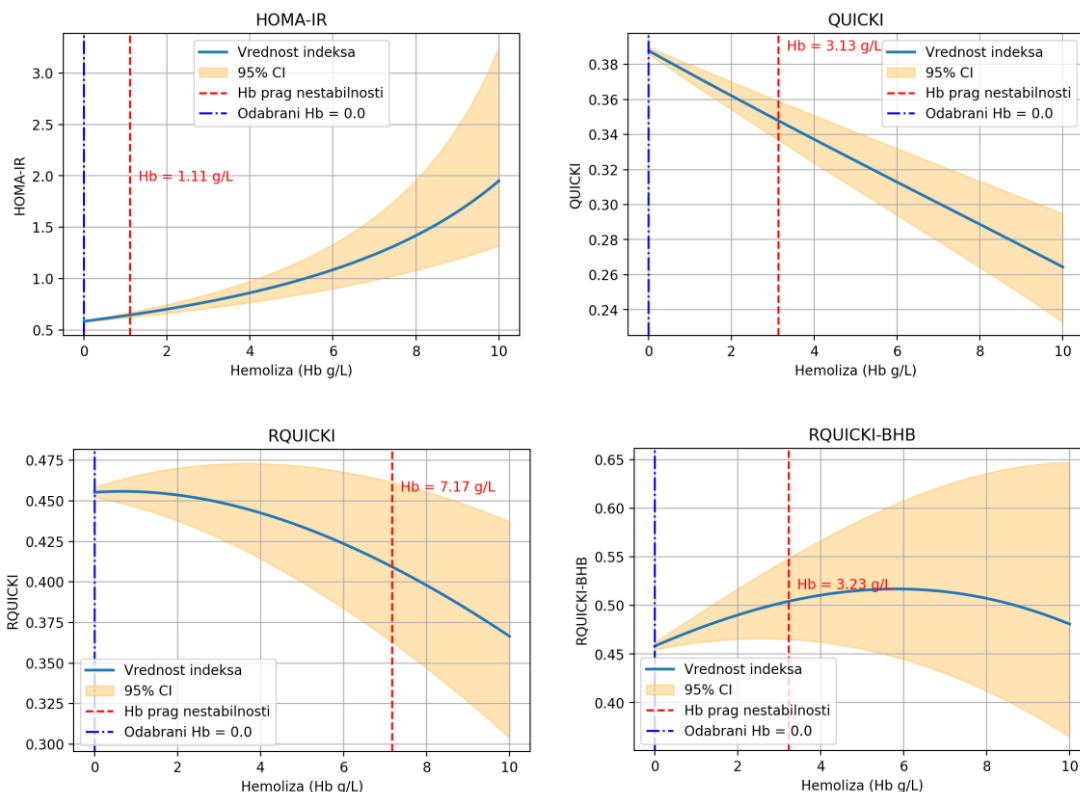
Koncentracija glukoze, NEFA i BHB vršena je pomoću standardnih reagenasa proizvođača Biosystems (Španija) i Randox (UK), a korišćen je spetrofotometar Chemray (Rayto, Kina). Koncentracija insulina određena je standardnom imunometrijskom metodom na aparatu Tosoh AIA360 (Japan). Indeksi insulinske rezistencije HOMA-IR, QUICKI, RQUICKI i RQUICKI-BHB određeni su prema standardnim formulama (Cincović et al., 2025).

Statistička analiza - Statistička obrada podataka zasnovana je na modelovanju uticaja hemolize (izražene kao koncentracija slobodnog hemoglobina, Hb 0–10 g/L) na biohemijske parametre (glukoza, insulin, NEFA i BHB) primenom prethodno definisanih linearnih regresionih jednačina za procenu procentualnog biasa ($\text{bias} = ax + b$), uz uvažavanje koeficijenta determinacije (R^2). Za svaki nivo Hb izračunata je korigovana vrednost parametara primenom transformacije $\text{measured}/(1 + \text{bias}/100)$, a nesigurnost procene modelovana je određivanjem 95% intervala pouzdanosti. Varijabilnost indeksa analizirana je kao funkcija Hb, a prag nestabilnosti definisan je kao najmanja vrednost Hb pri kojoj relativna promena indeksa u odnosu na vrednost pri Hb=0 prelazi unapred zadatu toleranciju od 10%. Rezultati su prikazani grafički sa 95% intervalima pouzdanosti.

Rezultati i diskusija

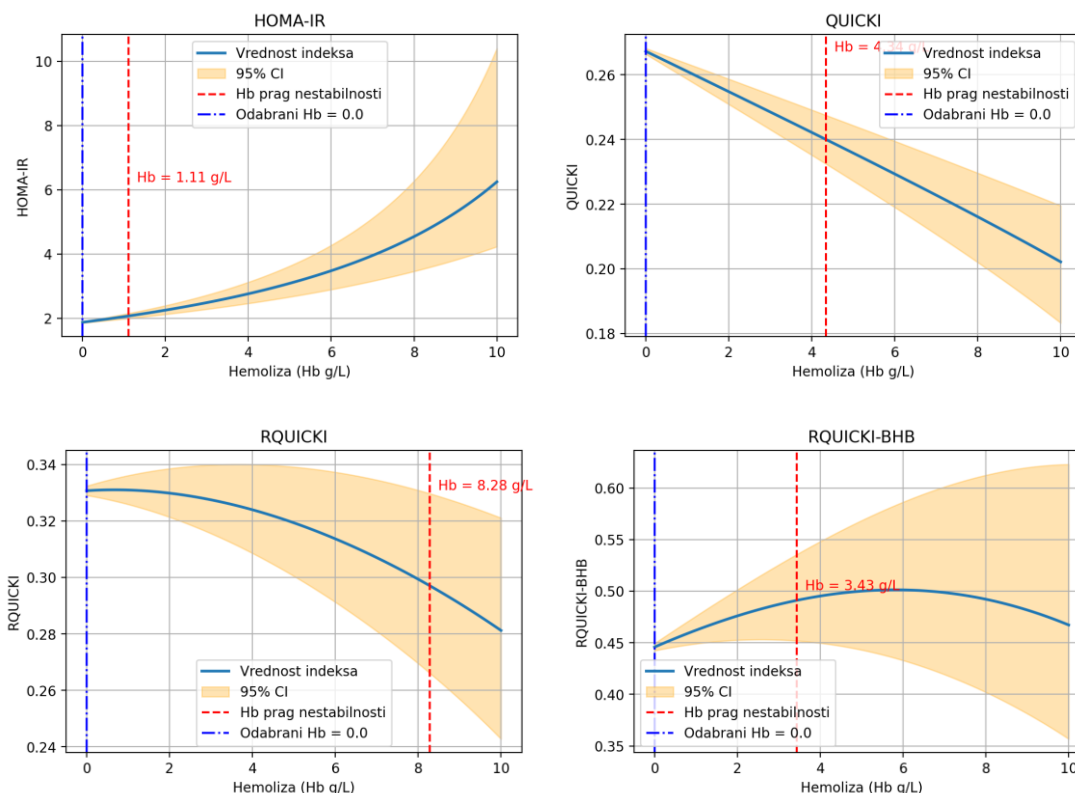
Indeksi insulinske rezistencije su nelinearno povezani sa slobodnim hemoglobinom (Hb) jer je veza između Hb i indeksa rezultat kompozicije više funkcija različitog tipa, od kojih je samo prvi korak linearan. Za svaki biohemijski parametar (GLU, INS, NEFA i BHB) bias se modeluje kao linearna funkcija Hb, ali se zatim korigovana vrednost dobija recipročnom transformacijom $\text{measured} / (1 + \text{bias}/100)$, što već predstavlja nelinearnu racionalnu funkciju Hb. Dodatnu nelinearnost uvode same formule indeksa: HOMA-IR je proizvod dve korigovane veličine, što pojačava zakrivljenost, dok QUICKI, RQUICKI i RQUICKI-BHB koriste logaritamske transformacije i inverznu funkciju, pri čemu logaritmi kompresuju promene, a inverzna funkcija menja intenzitet i smer varijacija. Ukupno, veza se može predstaviti kao kompozicija linearne funkcije, racionalne korekcije i logaritamsko-inverzne transformacije, što rezultira glatkom, monotono nelinearnom krivom, čija zakrivljenost zavisi od matematičke strukture pojedinačnog indeksa. Pogledati izgled regresione krive na grafikonima 1 i 2.

Nivo hemolize na kom će doći do nestabilnosti indeksa insulinske rezistencije kada se se njihovi rezultati moraju odbaciti kao neprecizni prikazan je na grafikonima ispod i on zavisi od početnih koncentracija insulina, glukoze, NEFA i BHB. HOMA-IR je najosetljiviji indeks na hemolizu jer je njegova formula direktan proizvod koncentracija insulina i glukoze, pa male promene u bilo kojem od ovih parametara, koje nastaju zbog linearnog bias-a sa slobodnim hemoglobinom, proporcionalno i direktno utiču na vrednost indeksa, što dovodi do brzog prelaska zadatog praga varijabilnosti. QUICKI i RQUICKI-BHB su nešto manje osetljivi jer koriste logaritamske transformacije i inverznu funkciju, koje delimično ublažavaju efekte promena u pojedinačnim parametrima; kod RQUICKI-BHB dodatno se uključuje BHB, koji je manje osetljiv na hemolizu od NEFA, što doprinosi intermedijarnoj osetljivosti. RQUICKI je najmanje osetljiv jer u zbiru logaritama sadrži parametre sa suprotnim bias-ima (INS i GLU opadaju, NEFA raste), što delimično poništava efekte hemolize obzirom da je NEFA prilično osetljiva na promene usld hemolize, održavajući stabilnost indeksa čak i pri višim koncentracijama slobodnog hemoglobina. Dakle, redosled osetljivosti indeksa na hemolizu je: HOMA-IR > QUICKI > RQUICKI-BHB > RQUICKI, pri čemu se razlike u osetljivosti direktno objašnjavaju njihovom matematičkom strukturom i načinom kombinovanja korigovanih parametara.



Grafikon 1. Koncentracija slobodnog Hb (nivo hemolize) pri kom će indeksi insulinske rezistencije pokazati varijabilnosti 10% (rana laktacija glukoza 2,5 mmol/L, insulin 4 mIU/L, NEFA 0,65 mmol/L i BHB 0,9 mmol/L).

Figure 1. Concentration of free hemoglobin (degree of hemolysis) at which insulin resistance indices exhibit 10% variability (early lactation: glucose 2.5 mmol/L, insulin 4 mIU/L, NEFA 0.65 mmol/L, and BHB 0.9 mmol/L).



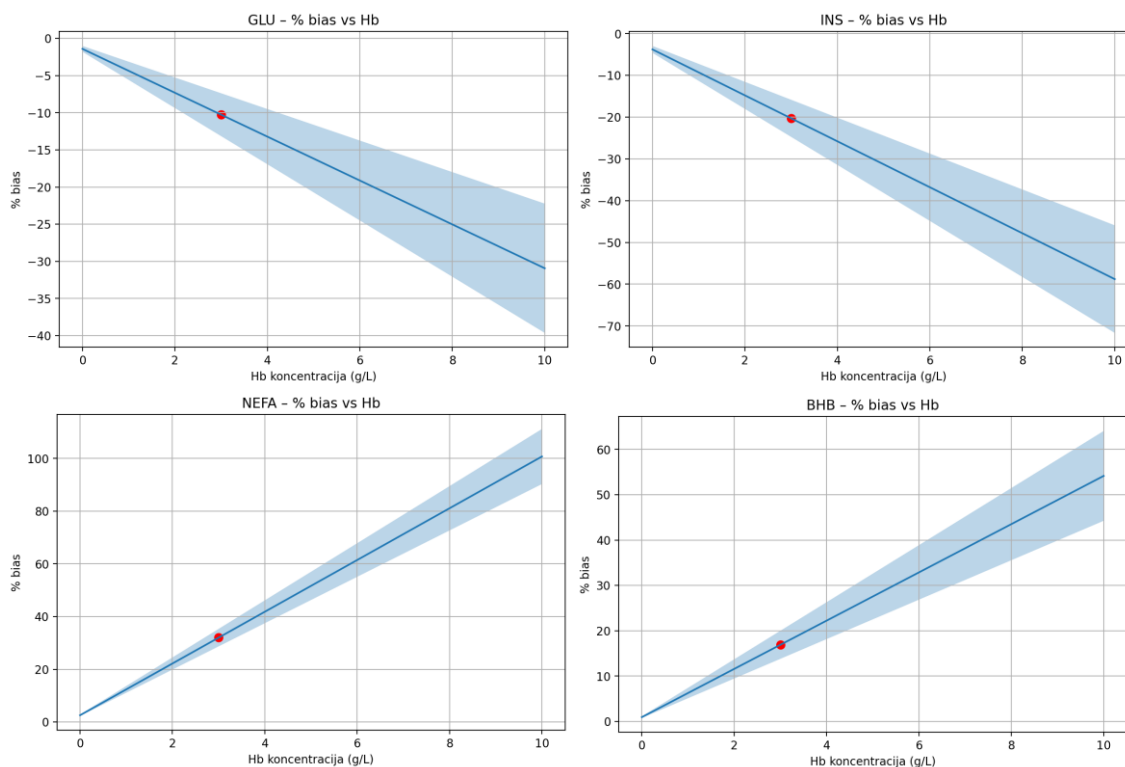
Grafikon 2. Koncentracija slobodnog Hb (nivo hemolize) pri kom će indeksi insulinske rezistencije pokazati varijabilnosti 10% (stabilna laktacija glukoza 3,8 mmol/L, insulin 11 mIU/L, NEFA 0,5 mmol/L i BHB 0,6 mmol/L).

Figure 2. Concentration of free hemoglobin (degree of hemolysis) at which insulin resistance indices exhibit 10% variability (mid-lactation: glucose 3.8 mmol/L, insulin 11 mIU/L, NEFA 0.5 mmol/L, and BHB 0.6 mmol/L).

Konkretno, u modelu INS i GLU imaju negativan bias, pa njihova korigovana koncentracija opada sa porastom Hb, dok NEFA i BHB imaju pozitivniji bias u većini slučajeva, što dovodi do blagog porasta ili sporijeg opadanja sa Hb. Ovaj linearno definisan bias u kombinaciji sa recipročnom transformacijom rezultuje glatkim, monotono promenljivim, ali nelinearnim krivama koncentracija parametara u funkciji Hb, pri čemu se male promene Hb reflektuju disproportionalno u vrednostima parametara i kasnije u nelinearnim indeksima insulinske rezistencije.

Neophodnost analize osetljivosti indeksa insulinske rezistencije sa simuliranim podacima iz rane i stabilne laktacije nastaje kao posledica toga što postoje značajna odstupanja u vrednosti glukoze, insulina, NEFA i BHB u različitim periodima laktacije. Njihovim međusobnim odnosom definiše se celokupna metabolička adaptacija krava (Belić et al., 2018). Koncentracija insulina i glukoze smanjena je u ranoj laktaciji u odnosu na ostale periode laktacije, kod je koncentracija NEFA viša. Ove promene su osnov insulinske rezistencije kod krava uranoj laktaciji. Smanjen unos hrane i negativni energetski bilans dovode do navedenih adaptacija u ranoj laktaciji. Identične promene u metaboličkom statusu nađene su prilikom restriktivne ishrane krava (Bjerre-Harpøth et al., 2012). Koncentracija insulina zavisi od perioda laktacije, a značajno je niža na početku laktacije. Ovakav rezultat je potvrđen od strane mnogih autora kroz linearni model koji dokazuje da postoji značajno opadanje insulina koji se održava na niskom nivou u prve četiri nedelje posle teljenja, da bi posle četvrte nedelje koncentracija insulina rasla (Wathes et al., 2007). Kod negativnog energetskog bilansa nivo insulina je gotovo bez izuzetka bio niži od 12 mIU/L (0,5 ng/ml), međutim kod krava sa pozitivnim bilansom energije koncentracija insulina varira od 6 do čak preko 50 mIU/L. Koncentracija NEFA je veća u prvim nedeljama posle teljenja. Koncentracija NEFA počinje da raste u nedeljama pre partusa, da bi u prvoj i drugoj nedelji posle partusa ta vrednost bila najveća i potom opada na početni nivo. Koncentracija NEFA zavisi od nivoa lipidne mobilizacije i stresne opterećenosti u ranoj laktaciji, a smatra se da vrednost NEFA preko 0,5 mmol/L povećava rizik za nastanak peripartalnih bolesti i uopšteno ogovreći utiče na metaboličku adaptaciju krava (Djokovic et al., 2019). Vrednosti glikemije su niže u prvim danima laktacije da bi sa vremenom rasle. Koncentracija glukoze u krvi preživara je relativno niža

nego kod monogastričnih životinja i kreće se u rasponu od 2,2 do 3,3 mmol/L. Utvrđeno je da glikemija prosečno iznosi na 10 do 15 dana do teljenja 2,71 mmol/L, do 10 dana posle teljenja 2,40 mmol/L, u drugom mesecu laktacije 2,60 mmol/L i u petom mesecu laktacije 2,70 mmol/L. Glikemija kod zdravih krava varira između 2,3 i 3,3 mmol/L. Kod subkliničkih ketoznih stanja glikemija se kreće od 1,7 do 2,7 mmol/L, a kod krava sa kliničkim simptomima bolesti je redovno manja od 1,9 mmol/L (VanSaun, 2023).



Grafikon 3. Promena vrednosti (%bias) glukoze, insulina, neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) i neta-hidroksibutirata (BHB) pod dejstvom slobodnog hemoglobina (nivoa hemoize).

Figure 3. Change in values (% bias) of glucose, insulin, non-esterified fatty acids (NEFA), and β -hydroxybutyrate (BHB) under the influence of free hemoglobin (degree of hemolysis).

Referentne vrednosti HOMA, QUICKI i RQUICKI ispitivani su i ranije kod krava u našoj populaciji (Cincović i sar 2015) i rezultati ovog ogleada se poklapaku sa navedenim nalazima. Vrednost HOMA iznosila je $18,86 \pm 5,43$. Nema puno podataka o vrednostima HOMA i insulinskoj rezistenciji kod krava. Haarstrich (2011) je ispitujući indekse insulinske rezistencije utvrdio vrednost HOMA od $31,1 \pm 14,9$. Navedena vrednost je viša od vrednosti koje smo dobili u našem radu, što se može pripisati činjenici da je navedeni autor ispitivanja radio kod krava koje su bile u 182. danu laktacije, a ne na početku laktacije. U ogledu u kom je vršeno ispitivanje uticaja deksametazona na nastanak insulinske rezistencije, pa je nađeno da indeks HOMA-IR iznosi oko 5 ± 1 , odnosno preko $15 \pm 2,5$ posle aplikacije deksametazona (Hackbart et al., 2013). Ovaj indeks ima manju reproducibilnost (veći koeficijent varijacije) u odnosu na QUICKI i RQUICKI, što se slaže sa ranije dobijenim rezultatima (Antuna-Puente et al., 2008). Vrednost QUICKI indeksa iznosila je $0,39 \pm 0,06$, dok je RQUICKI iznosila $0,45 \pm 0,06$. Distribucija frekvencije vrednosti oba parametra nagnuta je na desnu stranu, sa dominacijom ispodprosečnih vrednosti, što ukazuje da ispitana populacija naginje ka umanjenoj insulinskoj senzitivnosti, odnosno insulinskoj rezistenciji. Nema puno literaturnih izvora koji govore o vrednosti QUICKI kod mlečnih krava. Naši rezultati se slažu sa rezultatima Haarstrich-a (2011). Vrednost QUICKI kod teladi je nešto viša $0,52 \pm 0,039$ (Bossaert et al., 2009). Kod mlečnih krava je nađeno da je RQUICKI indeks najpogodniji za procenu insulinske rezistencije, te je u najvećem broju publikacija ovaj indikator prikazan kao rezultat. RQUICKI i RQUICKI-BHB indeks izmeren je u rasponu od 0,38 do 0,65 (Holtenius and Holtenius, 2007; Balogh et al., 2008; Haarstrich, 2011; Delić et al., 2020), u okviru kog se nalazi i naš rezultat.

Upotrebljivost surogat-indeksa insulinske rezistencije ima svoje utemeljenje u direktnim i indirektnim metodama kao što su HIEC i IVGTT. Rezultati istraživanja su pokazali da indikatori kao što su HOMA, QUICKI i RQUICKI imaju visok nivo koeficijenta determinacije sa izračunatim pokazateljima

insulinske senzitivnosti dobijenih iz HIEC metode (Lee et al., 2008; Izjerman et al., 2009; Dasgupta and Shetty, 2024). U rezultatima koje je dobio Haarstrich (2011) u svojoj doktorskoj disertaciji navodi se da postoji pozitivna korelacija indeksa insulinske senzitivnosti dobijenog iz HIEC sa vrednostima QUICKI i RQUICKI odnosno negativna korelacija sa vrednostima HOMA. Ovaj autor je koristio rastuću koncentraciju insulina, a navedeni rezultat se odnosi na merenja koja je dobio kada je koristio najmanju koncentraciju insulina, što odgovara situaciji posebno u ranoj laktaciji, kod ketoze ili kod izuzetno visoke proizvodnje mleka kod krava. Pored navedenog ispitivani su koeficijenti determinacije i korelacija indikatora insulinske rezistencije sa rezultatima intravenskog glukoza tolerans testa. Balogh et al., (2008) su pronašli da postoji negativna korelacija između RQUICKI i parametara dobijenih posle glukoza tolerans testa (pik glukoze, vremenska dinamika promene glikemije, AUC glukoze). Takođe je nađeno da RQUICKI pokazuje veći stepen korelacije sa parametrima iz HIEC u odnosu na QUICKI i HOMA indeks (Rabasa-Lhoret et al., 2003). Sve navedeno ukazuje da je upotreba indikatora kao što su HOMA, QUICKI i RQUICKI utemeljena kada se vrši procena insulinske rezistencije. Djoković i sar., (2017) su pronašli značajne korelacije RQUICKI indeksa insulinske rezistencije i IVGTT parametara kod krava u ketozi. Dodatno, indeksi insulinske rezistencije značajno su povezani sa metaboličkim parametrima kod krava u ranoj laktaciji (Cincović et al., 2017).

Zaključak

Indeksi insulinske rezistencije su osetljivi na hemolizu, a redosled osetljivosti od najosetljivijeg ka najmanje osetljivom je: HOMA-IR > QUICKI > RQUICKI-BHB > RQUICKI, pri čemu se razlike u osetljivosti direktno objašnjavaju njihovom matematičkom strukturom i načinom kombinovanja korigovanih parametara. HOMA-IR dostiže visoke varijabilnosti pri vrlo niskim koncentracijama slobodnog hemoglobina od 1,1 g/L, QUICKI i RQUICKI-BHB su stabilni u uslovima umerene hemolize od 3-4 g/L, dok će RQUICKI ostati stabilan i pri uzraženju hemolizi od preko 7 g/L slobodnog hemoglobina. Izveštavanje o koncentraciji slobodnog hemoglobina i vizuelne procene uzorka u eksperimentima gde se koriste indeksi insulinske rezistencije kod krava je neophodan.

Zahvalnost

Ovaj rad je rezultat inovativnog projekta „Procena realne koncentracije biohemijskih parametara: softverski alat zasnovan na preanalitičkim faktorima”, broj 003785865 2025 09418 003 000 000 001 koji finansira Pokrajinski sekretarijat za visoko obrazovanje i naučno-istraživačku delatnost AP Vojvodine.

Literatura

- Antuna-Puente, B., Faraj, M., Karelis, A.D., Garrel, D., Prudhomme, D., Rabasa-Lhoret, R., Bastard J.-P. 2008. HOMA or QUICKI: Is it useful to test the reproducibility of formulas? *Diabetes & Metabolism*, 34, 3, 294–296.
- Balogh, O., Szepes, O., Kovacs, K., Klucsar, M., Reiczigel, J., Alcazar, J.A., Keresztes, M., Febel, H., Bartyik, J., Fekete, S.G., Fesus, L., Huszenicza, G. 2008. Interrelationship of growth hormone Alul polymorphysm, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. *Veterinarni Medicina*, 53, 11, 604-616.
- Belić, B., Cincović, M., Lakić, I., Đoković, R., Petrović, M., Ježek, J., Starić, J. 2018. Metabolic status of dairy cows grouped by anabolic and catabolic indicators of metabolic stress in early lactation. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46, 9, 9.
- Bjerre-Harpøth, V., Friggens, N.C., Thorup, V.M., Larsen, T., Damgaard, B.M., Ingvarsen, K.L., Moyes, K.M. 2012. Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 95, 5, 2362-2380.
- Bossaert P., Leroy J.L.M.R., De Campeneere S., De Vlieghe S., Opsomer G. 2009. Differences in the glucose induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. *J Dairy Sci*, 92, 9, 4404-4411.
- Cincović, M. R., Đoković, R., Belić, B., Lakić, I., Stojanac, N., Stevančević, O., Staničkov, N. 2018. Insulin resistance in cows during the periparturient period. *Acta Agriculturae Serbica*, 23, 46, 233-245.
- Cincović, M., Belić, B., Lakić, I., Galić, I., Zahirović, N., Toholj, B., Stančić I., Todorović, S. 2019. Uticaj telesne kondicije i graviditeta na insulinsku rezistenciju kod junica. *Letopis naučnih radova*, 43, 2, 157-163.
- Cincović, M., Belić, B., Stevančević, M., Toholj, B., Starić, J., Smolec, O., Petrović M., Hristovska, T. 2015. Referentni opseg vrednosti indeksa insulinske senzitivnosti kod krava u ranoj laktaciji. *Letopis naučnih radova*, 39, 1, 121-128.
- Cincović, M., Kirovski, D., Vujanac, I., Belić, B., Djoković, R. 2017. Relationship between the indexes of insulin resistance and metabolic status in dairy cows during early lactation. *Acta Veterinaria*, 67, 1, 57-70.

- Cincović, M., Stojanović, D., Djoković, R., Majkić, M., Starić, J., Petrović, M., Kovačević, Z. 2025. Relation Between Inflammatory Parameters and Insulin Resistance Indices in Cows During Early Lactation. *Metabolites*, 15, 11, 751.
- Dasgupta, R., Shetty, S.P. 2024. Assessment of insulin resistance: From the bench to bedside. *Metabolic Syndrome*, 351-365.
- De Koster, J.D., Opsomer, G. 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29, 2, 299-322.
- Delić, B., Belić, B., Cincović, M. R., Djokovic, R., Lakić, I. 2020. Metabolic adaptation in first week after calving and early prediction of ketosis type I and II in dairy cows. *Large Animal Review*, 26, 2, 51-55.
- Došenović Marinković, M., Cincović, M., Majkić, M., Kovačević, D., Blond, B. 2022. Dinamičke promene koncentracije insulina, glukoze, neesterifikovanih masnih kiselina i indeksa insulinske rezistencije oko teljenja i metabolička adaptacija krava u ranoj laktaciji. *Letopis naučnih radova*, 46, 1-2, 76-84.
- Djokovic, R., Cincovic, M., Ilic, Z., Kurcubic, V., Andjelic, B., Petrovic, M., et al. 2019. Relationships between contents of biochemical metabolites in blood and milk in dairy cows during transition and mid lactation. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 17, 1, 1-9.
- Djoković, R., Dosković, V., Cincović, M., Belić, B., Fratrić, N., Jašović, B., Lalović, M. 2017. Estimation of Insulin Resistance in Healthy and Ketotic Cows during an Intravenous Glucose Tolerance Test. *Pakistan Veterinary Journal*, 37, 4.
- Fajin, D., Davidov, I., Ružić, Z., Majkić, M., Cincović M. 2025. Uticaj dužine i temperature čuvanja kontrolnog seruma na stabilnost biohemijskih parametara. *Letopis naučnih radova / Annals Of Agronomy* , 49, 2, 31-37.
- Haarstrich, D. 2011. Evaluation of surrogate indices of insulin sensitivity by means of hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamps in dairy cows; u: Insulinsensitivität und Insulinresponse nach einer Langzeit-Supplementation von konjugierten Linolsäuren bei laktierenden Milchkühen. Inaugural disertation. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Hackbart, K.S., Cunha, P.M., Meyer, R.K., Wiltbank, M.C. 2013. Effect of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance on Follicle Development and Ovulation. *Biol. Reprod.* doi:10.1095/biolreprod.113.107862.
- Hasegawa, R., Iwase, I., Takagi, T., Kondo, M., Matsui, M., Kawashima, C. 2019. Insulin resistance: Relationship between indices during late gestation in dairy cows and effects on newborn metabolism. *Animal Science Journal*, 90, 12, 1544-1555.
- Hayirli, A. (2006). The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary research communications*, 30(7), 749-774.
- Holtenius, P., Holtenius, K. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49, 1, 29.
- Ijzerman, R.G., Stehouwer, C.D., Serne, E.H., Voordouw, J.J., Smulders, Y.M., Delemarre-van de Waal, H.A., van Weissenbruch, M.M. 2009. Incorporation of the fasting free fatty acid concentration into quantitative insulin sensitivity check index improves its association with insulin sensitivity in adults, but not in children. *Eur J Endocrinol.* 160, 1, 59-64.
- James, D.E., Stöckli, J., Birnbaum, M.J. 2021. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 11, 751-771.
- Kovačević, D., Cincović, M., Majkić, M., Spasojević, J., Djoković, R., Nikolić, S. et al. 2024. Analytical and Clinical Interference of Sample Hemolysis in Evaluating Blood Biochemical and Endocrine Parameters in Cows. *Animals*, 14, 12, 1773.
- Krnjaić, S., Đoković, R., Majkić, M., Starić, J., Cincović, M. 2024. Uticaj frekvencije muže na povezanost mobilizacije lipida i pokazatelja funkcionalnog statusa jetre kod krava u laktaciji. *Letopis naučnih radova / Annals Of Agronomy* , 48, 1, 1-8.
- Lee, S., Muniyappa, R., Yan, X., Chen, H., Yue, L.Q., Hong, E.G., Kim, J.K., Quon, M.J. 2008. Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294, 2, E261-270.
- Lee, S.H., Park, S.Y., Choi, C.S. 2022. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies. *Diabetes & metabolism journal*, 46, 1, 15-37.
- Marković, M., Stojanović, D., Hristovska, T., Petrović, K., Cincović, M., Majkić, M. 2025. Ispitivanje efekta tretmana niacinom na metaboličku stabilnost hepatocita krava u ranoj laktaciji. *Letopis naučnih radova / Annals Of Agronomy* , 49, 2, 38-45.
- National Research Council, Committee on Animal Nutrition, & Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*. National Academies Press.
- Qiao, K., Jiang, R., Contreras, G. A., Xie, L., Pascottini, O. B., Opsomer, G., Dong, Q. 2024. The complex interplay of insulin resistance and metabolic inflammation in transition dairy cows. *Animals*, 14, 6, 832.
- Rabasa-Lhoret, R., Bastard, J.P., Jan, V., Ducluzeau, P.H., Andreelli, F., Guebere, F., Bruzeaz, J., Louche-Pellissier, C., Maitrepierre, C., Peyrat, J., Change, J., Vidal, H., Laville, M. 2003. Modified Quantitative Insulin Sensitivity Check Index Is Better Correlated to Hyperinsulinemic Glucose Clamp than Other Fasting-Based Index of Insulin Sensitivity in Different Insulin-Resistant States. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 10, 4917-4923.
- Simundic, A. M., Baird, G., Cadamuro, J., Costelloe, S. J., Lippi, G. 2020. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 57, 1, 1-21.
- Uçar, K. T., Çat, A., Gümüş, A., Nurlu, N. 2022. Interferograms plotted with reference change value (RCV) may facilitate the management of hemolyzed samples. *Journal of Medical Biochemistry*, 41, 1, 53.

- Van Saun, R.J. 2023. Metabolic profiling in ruminant diagnostics. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 39, 1, 49-71.
- Wathes, D.C., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V.J., Coffey, M.P., Brotherstone, S. 2007. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology*, 33, 2, 203-225.
- Zhao, X., An, X., Yang, C., Sun, W., Ji, H., Lian, F. 2023. The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1149239.

Impact of Sample Hemolysis on Insulin Resistance Indices in Cows

Marko Cincović^{a*}, Nikolina Milošević^a, Mira Majkić^a, Jovan Spasojević^a, Nada Plavša^a

^aUniversity of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia

*Corresponding author: mcincovic@gmail.com

ABSTRACT

Insulin resistance is characterized by a reduced insulin response to glucose, i.e., decreased pancreatic β -cell function (insulin hyporesponsiveness), and/or reduced glucose response to insulin, i.e., impaired glucose uptake into tissues under the effect of insulin (insulin sensitivity). In dairy cows, assessing energy status and glucose regulation has become increasingly important due to the rising demand for high-quality milk production and optimal animal health. In this context, insulin resistance indices such as HOMA (Homeostatic Model Assessment), QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), RQUICKI (Revised QUICKI including nonesterified fatty acids, NEFA), and RQUICKI-BHB (RQUICKI including β -hydroxybutyrate, BHB) provide a simple yet reliable approach to quantify insulin sensitivity. These indices are calculated using specific formulas incorporating glucose, insulin, NEFA, and BHB concentrations. These parameters are highly influenced by sample hemolysis, which can introduce significant bias in their measured values. The aim of this study was to determine the level of sample hemolysis that induces sufficient changes in these parameters to result in insulin resistance index values exceeding an acceptable variability threshold of 10%. The results indicate that insulin resistance indices are nonlinearly associated with free hemoglobin (Hb). The indices are sensitive to hemolysis, with the rank order of sensitivity from most to least sensitive being: HOMA-IR > QUICKI > RQUICKI-BHB > RQUICKI, where the differences in sensitivity are directly attributable to their mathematical structure and the manner in which corrected parameters are combined. HOMA-IR exceeds the typical 10% variability threshold at very low free hemoglobin concentrations of 1.1 g/L, while QUICKI and RQUICKI-BHB become unstable within the range of 3.2–4.2 g/L, and RQUICKI remains stable even under pronounced hemolysis of 7–8 g/L. Higher levels of hemolysis than these necessitate sample rejection. Therefore, reporting free hemoglobin concentrations and performing visual assessments of sample hemolysis are essential in experiments employing insulin resistance indices in dairy cows.

KEY WORDS

Insulin sensitivity, cell-free hemoglobin, dairy cows, sample handling

Rad primljen: 17.2.2026.

Ispravljen: 14.4.2026.

Prihvaćen: 25.4.2026.

Objavljen: 18.5.2026.