LETOPIS NAUČNIH RADOVA / ANNALS OF AGRONOMY
Vol. 40, No 1, 100-104
UDK: 636.09

Poljoprivredni fakultet
Univerzitet u Novom Sadu

# Adenozin trifosfat (ATP) kao indikator hemolize uzoraka krvi kod krava

Marko R. Cincović[a]*, Branislava Belić[a], Jože Starič[b], Jožica Ježek[b], Ivana Lakić[a]

[a]Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija
[b] Univerzitet u Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Klinika za prežvekovalce, Ljubljana, Slovenija
*Autor za kontakt: mcincovic@gmail.com

**SAŽETAK**
Hemoliza uzorka je najčešća preanalitička greška i razlog za odbacivanje uzorka. Cilj ovog rada je da se utvrdi da li koncentracija ATP-a u serumu može biti pokazatelj hemolize u uzorcima krvi krava. U ogled je uključeno 30 uzoraka krvi krava, koje su retrospektivno odabrane na osnovu vizuelne inspekcije seruma. Krv uzeta od 10 krava je bila bez vidljive hemolize, kod 10 krava je postojala umerena hemoliza, a kod 10 krava je postojala izražena hemoliza. Rezultati istraživanja pokazuju da koncentracija slobodnog hemoglobina i ATP-a u serumu rastu sa intenzitetom hemolize. Utvrđena je značajna pozitivna korelacije između koncentracije hemoglobina i ATP-a. Interesantan nalaz je da u kontrolnoj grupi uzoraka u kojoj nije vizuelno procenjeno postojanje hemolize takođe postoji značajna pozitivna korelacija između ATP-a i slobodnog hemoglobina. ATP može biti koristan indikator hemolize uzorka. Promena vrednosti ATP-a u funkciji slobodnog hemoglobina podleže i nekim drugim mehanizmima koji nisu vezani isključivo za intenzitet hemolize, što zahteva dodatna istraživanja.

**KLJUČNE REČI**
krave,uzorci krvi, hemoliza, ATP

## Uvod

Hemoliza uzorka predstavlja najčešću predanalitičku grešku (Humann-Ziehank i Ganter, 2012; Braun i sar., 2015). Rezultati naših istraživanja pokazuju da u sto slučajno odabranih uzoraka sa greškom preko 60% se nalazi hemoliza kao greška u uzorku (Belic i sar., 2015). Hemoliza se prepoznaje na osnovu prebojavanja seruma posle centrofugovanja uzorka, a određivanje koncentracije slobodnog hemoglobina predstavlja takođe značajni pokazatelj hemolize. Postoje i druge metode za procenu intenziteta hemolize kao što je određivanje koncentracije onih materija u serumu kojih ima mnogo više u eritrocitima nego u ekstraeritrocitnom prostoru odnosno krvnoj plazmi i serumu. Koncentracija ATP-a u citosolu eritrocita se nalazi na nivou milimola, dok rezultati ispitivanja pokazuju da je koncentracija ATP-a u serumu 100-1000 puta niža, što znači da veoma slaba hemoliza može dovesti do značajnog porasta koncentracije ATP-a u serumu (Gorman i sar., 2007). Novija istraživanja pokazuju da je hmoliza primarni mehanizal lučenja ATP-a kod humanih eritrocita (Sikora i sar., 2014). Cilj ovog rada je da se utvrdi da li koncentracija ATP-a može biti pokazatelj hemolize u uzorcima krvi krava.

## Materijal i metod

Životinje i uzorkovanje: U ogled je uključeno 30 uzoraka krvi krava, koje su retrospektivno odabrane na osnovu vizuelne inspekcije seruma. Krv uzeta od 10 krava je bila bez vidvljive hemolize, kod 10 krava je postojala umerena hemoliza, a kod 10 krava je postojala izražena hemoliza. Krave su bile u ranoj laktaciji, 5-10 dana posle teljenja. Krave su hranjene dva puta dnevno TMR smeštom, a obrok je balansiran u skladu sa potrebama krava za taj proizovdni period. Voda je bila dostupna ad libitum.

Ispitivanje hemolize: Hemoliza je utvrđena na osnovu prebojenosti seruma posle centrifugiranja, a određena je i koncentracija slobodnog hemogolobina čija je vrednost očitana spektrofotometrijski.

Određivanje koncentracije ATP: Koncentracija ATP u serumu određena je pomoću standardnog kolorimetrijskog kita i očitana je spektrofotometrijski.

Statistička analiza: Ispitana je razlika koncentracija slobodnog hemoglobina i ATP-a u uzorku seruma koji potiču od krava bez hemolize, sa umerenom i izraženom hemolizom (ANOVA i naknadni LSD test). Potom je ispitana linearna regresija i korelacija između slobodnog hemoglobina i koncentacije ATP-a. Da bi se utvrdilo da li je upotreba ATP-a kao indikatora hemolize pouzdana ispitana je segmentirana korelacija posebno u grupi krava bez hemolize, sa umerenom i izraženom hemolizom.

## Rezultati i diskusija

U Tabeli 1 prikazan je uticaj intenziteta hemolize na vrednost slobodnog hemoglobina i ATP. Koncentracija slobodnog hemoglobina i ATP-a u serumu rastu sa intenzitetom hemolize koja je vizuelno procenjena. ANOVA analiza i LSD test pokazuju da je ovaj porast statistički značajan kako za ATP tako i za slobodni hemoglobin.

Utvrđena je značajna pozitivna korelacije između koncentracije hemoglobina i ATPa. Korelacija je statistički značajna čak i kada je analiziramo segmentirano u svakoj od grupa formiranih na osnovu vizuelne procene hemolize. Interesantan nalaz je da u grupi uzoraka u kojoj nije vizuelno procenjeno postojanje hemolize takođe postoji značajna pozitivna korelacija između ATP-a i slobodnog hemoglobina. Porast vrednosti ATP u funkciji slobodnog hemoglobina (intenzitet hemolize) je najintenzivniji u uzorcima krvi u kojima vizuelno nije detektovana hemoliza, dok u uzorcima sa intenzivnijom hemolizom vrednosti ATP pokazuje nešto niži intenzitet porasta. Navedeni rezultati mogu pokazati da odavanje ATP-a podleže i nekim drugim mehanizmima koji nisu vezani za intenzitet hemolize, što zahteva dodatna istraživanja. Rehzultati su prikazani u grafikonima 1-4.

U literaturi nema puno podataka o koncentraciji ATP-a u serumu životinja. Kod pasa je utvrđena koncentracija 25-30 nmol/L (Gorman i sar., 2003). Različita istraživanja kod ljudi pokazala su da se koncentracija ATP-a u plazmi kreće od 120 do 11000 nmol/L (Gorman i sar., 2007). Razlike u koncentraciji ATP-a mogu biti u vezi sa konzervansima koji su dodavani ili u vezi sa protokolom koji je korišćen u ogledima. Eritrociti ljudi su potentni da izvrše kompletnu defosforilizaciju APT-a do adenozina, što može uticati na njegovu vrednost u krvi (Montalbetti i sar., 2011). Kod krava u ranoj laktaciji postoji oboljenje koje se naziva postpartalna hemoglobinurija, koja nastaje kao posledica hipofosfatemije. Smatra se da odavanje hemoglobina i intravaskularna hemoliza u ovoj bolesti nastaju kao posledica toga što nedostatak intracelularnog fosfata smanjuje sintezu ATP-a. ATP je potreban u cilju kontrole zapremine eritrocita i njihove sklnosti ka deformisanju. Ipak izazivanje hipofofatemije kod krava ne znači da će doći do pada intraeritrocitnog fosfata i promene u osmotskoj fragičnosti eritrocita (Grünberg i sar., 2015).

Ranija *in vitro* istraživanja pokazala su da je mehanička deformacija značajan stimulus za lučenje ATP-a iz eritrocita, a pokazan je i uticaj hipoksije. Takođe u *in vivo* ispitivanjima pokazano je da je intravaskularna hemoliza značajan izvor esktracelularnog ATP-a (Bergfeld i sar.,1992; Sprague i sar., 1996; Forsyth i sar., 2012; Mairbäurl, 2013). Značajan mehanički stimulus je hipoonični šok koji zbog gradijenta tečnosti i jona dovodi do ulaska tečnosti u eritrocite prilikom čega može doći do njihovog pucanja kada se pređe prag rastegljivosti zida eritrocita. U ogledu koji su sproveli Sikora i sar. (2014) korišćen je hipotonični šok kao uzrok hemolize i utvrđena je značajna korelacija između kestracelularnog ATP i slobodnog hemoglobina, a potvrđeno je da ATP izlazi samo iz liziranih eritrocita u spoljašnju sredinu (što je potvrđeno vizualizacijom ATP-a eritrocita pomoću luminiscentnih enzima).

**Tabela 1**

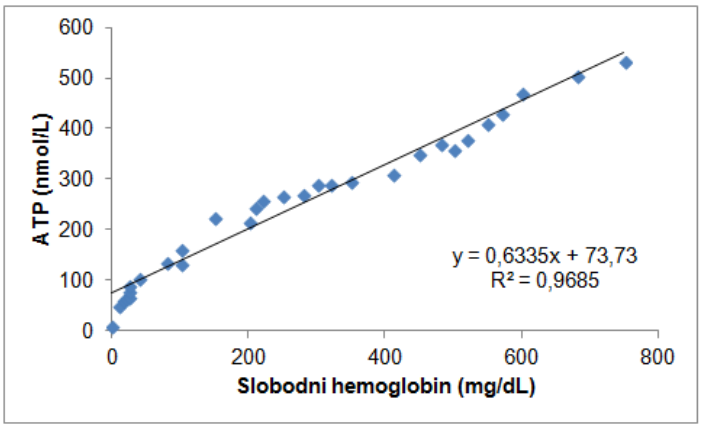
Koncentracija ATP i slobodnog hemoglobina u uzorcima krvi krava sa različitim stepenom hemolize

**Table 1**

Concnetration of ATP and free hemoglobin in cows blood sample with different intensity of hemolysis

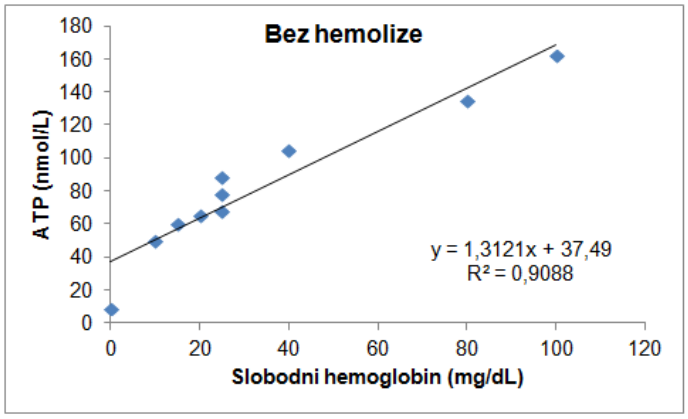
| Parametar | | Bez hemolize | Umerena hemoliza | Izražena hemoliza | ANOVA |
|---|---|---|---|---|---|
| ATP (nmol/L) | Srednja vr. (min-max) | 82,1[a] (9-162) | 248,8[b] (132-295) | 411,7[c] (310-532) | p<0,0001 |
| Sl.hemoglobin (mg/dL) | Srednja vr. (min-max) | 34 [a] (0-100) | 238,1[b] (101-400) | 551[c] (401-1000) | p<0,0001 |

[a, b, c] – Različite oznake u superskriptu znače postojanje statistički značajne ratlike između grupa, minimalno p<0,01



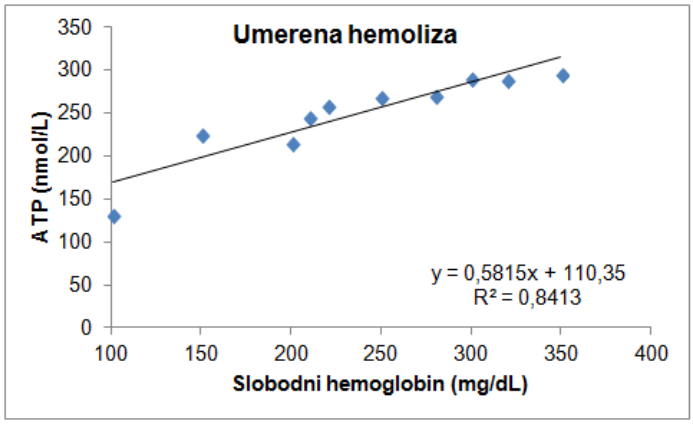

**Grafikon 1.** Linearna korelacija i regresija između između koncentracije slobodnog hemoglobina i ATP-a u serumu

**Figure 1.** Linear correlation and regression between free hemoglobin and ATP in blood serum



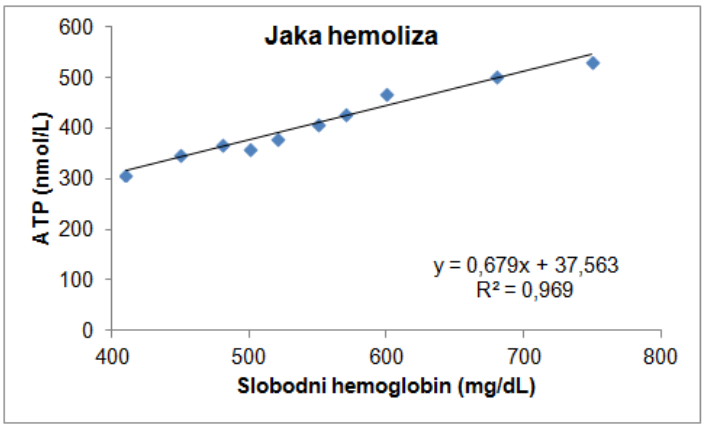

**Grafikon 2.** Linearna korelacija i regresija između koncentracije slobodnog hemoglobina i ATP-a u uzorcima bez hemolize.

**Figure 2.** Linear correlation and regression between free hemoglobin and ATP in control samples (no hemolysis)




**Grafikon 3.** Linearna korelacija i regresija između koncentracije slobodnog hemoglobina i ATP-a u uzorcima sa umerenom hemolizom.

**Figure 3.** Linear correlation and regression between free hemoglobin and ATP in samples with moderate hemolysis




**Grafikon 4.** Linearna korelacija i regresija između koncentracije slobodnog hemoglobina i ATP-a u uzorcima sa jakom hemolizom.
**Figure 4.** Linear correlation and regression between free hemoglobin and ATP in samples with severe hemolysis

## Zaključci

Koncentracija ATP u serumu krava pozitivno korelira sa vrednostima slobodnog hemoglobina pa može biti veoma kvalitetan pokazatelj intenziteta hemolize čak i u uzorcima u kojima ne postoji hemoliza koja se može detektovati vizuelnim pregledom seruma. Porast vrednosti ATP u funkciji slobodnog hemoglobina (intenzitet hemolize) je najintenzivniji u uzorcima krvi u kojima vizuelno nije detektovana hemoliza, dok u uzorcima sa intenzivnijom hemolizom vrednosti ATP pokazuje nešto niži intenzitet porasta. Navedeni rezultati mogu pokazati da odavanje ATP-a podleže i nekim drugim mehanizmima koji nisu vezani za intenzitet hemolize, što zahteva dodatna istraživanja.

## Zahvalnica

Ovaj rad je deo bilateralnog projekta Srbija-Slovenija “Laboratorijski pokazatelji metaboličkog statusa krava u ranoj laktaciji”.

## Literatura

Belić, B., Cincović, M.R., Kovačević, Z., Stojanović, D., Plavša, N., Spasojević, J., Petrović, M. 2015. Najčešće preanalitičke greške u vakutajnerima sa uzorcima krvi dobijenim od krava. Zbornik 26. Savetovanja veterinara Srbije.

Bergfeld, GR, Forrester, T. 1992. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. Cardiovasc Res. 26(1):40–47.

Braun, J.P., Bourges Abella, N., Gefre, A., Concordet, D., Trumel, C. 2015. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. Vet Clin Pathol 44(1):8–25.

Forsyth, A.M., Braunmüller, S., Wan, J., Franke, T., Stone, H.A. 2012. The effects of membrane cholesterol and simvastatin on red blood cell deformability and ATP release. Microvasc Res. 83(3):347–351.

Gorman, M.W., Feigl, E.O., Buffington, C.W. 2007. Human plasma ATP concentration. Clinical chemistry 53(2):318-325.

Gorman, M.W., Marble D.R., Ogimoto, K., Feigl, E.O. 2003. Measurement of adenine nucleotides in plasma. Luminescence 18:173–81.

Grünberg, W., Mol, J.A., Teske, E. 2015. Red Blood Cell Phosphate Concentration and Osmotic Resistance During Dietary Phosphate Depletion in Dairy Cows. J Vet Intern Med 29:395–399.

Humann-Ziehank, E., Ganter, M. 2012. Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics. Animal, 6(7):1115–1123.

Mairbäurl, H. 2013. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. Front Physiol. 4:332.

Montalbetti, N., Leal Denis, M.F., Pignatoro, O.P., Kobatake, E., Lazarowski, E.R., Schwarzbaum, P.J. 2011. Homeostasis of Extracellular ATP in Human Erythrocytes. The journal of biological chemistry 286(44): 38397–38407.
Sikora, J., Orlov, S.N., Furuya, K., Grygorczyk, R. 2014. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. Blood 124(13): 2150–2157.
Sprague, R.S., Ellsworth, M.L., Stephenson, A.H., Lonigro, A.J. 1996. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. Am J Physiol. 271(6 Pt 2):H2717–H2722.

# Adenosine triphosphate (ATP) is an indicator of hemolysis in dairy cow blood samples

Marko R. Cincović[a]*, Branislava Belić[a], Jože Starič[b], Jožica Ježek[b], Ivana Lakić[a]

[a]University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia
[b] University of Ljubljana, Veterinary faculty, Clinic for ruminants, Ljubljana, Slovenija
*Corresponding author: mcincovic@gmail.com

**ABSTRACT**
Hemolysis is the most frequent pre-analytical sample error and the reason for the rejection of the sample. The aim of this study is to determine whether the concentration of ATP in serum can be an indicator of hemolysis in blood samples of cows. The experiment included 30 blood samples from cows that have been retrospectively selected based on visual inspection of the serum. Blood was taken from 10 cows were no visible hemolysis, in 10 cows there was a moderate hemolysis, and with 10 cows existed expressed hemolysis. The concentrations of free hemoglobin and ATP in serum increase with the intensity of visually estimated hemolysis. There was a significant positive correlation between the concentration of hemoglobin and ATP. The correlation is statistically significant even in control group without hemolysis. ATP can be a significant indicator of blood sample hemolysis in dairy cows. Increase concentration of ATP in function of free hemoglobin is not linked only to the intensity of hemolysis, which requires additional research.

**KEY WORDS**
cows, blood sample, hemolysis, ATP

Primljen:17.11.2016.
Prihvaćen: 05.12.2016.