

De invloed van heparine in bloedafname systemen op de meting van vrij thyroxine

J.L.M.L. van RIJN en E. ENDERT

In het kader van het vaststellen van referentiewaarden voor diverse dynamisch endocriene functietesten, werd in het Laboratorium Endocrinologie en Radiochemie van het Academisch Medisch Centrum ook de TRH-test geëvalueerd bij een vijftigtal gezonde vrijwilligers. Eén van de parameters die hierbij werd gemeten was het vrije thyroxine (FT4). Tijdens de analyse van de verkregen resultaten viel het op dat twee vrijwilligers een FT4 concentratie hadden die 2 maal hoger was dan het gemiddelde van de andere personen, ondanks een normaal thyroïdstimulerend hormoon (TSH) en een normale TSH-respons na toediening van "thyrotropin-releasing" hormoon. Navraag bij de doktersassistenten die de functietesten verrichtten leerde, dat een kleine hoeveelheid heparine-oplossing werd gebruikt om tijdens de test het bloed afnamesysteem "open" te houden.

Wij onderzochten of het mogelijk was dat heparine in het afnamesysteem kon leiden tot een significante stijging van de FT4-waarden.

Trefwoorden: heparine; vrije vetzuren; vrij thyroxine; bloedafname

MATERIAAL en METHODEN

Effect van bewaren van bloed, plasma en serum

Van 8 patiënten, zonder schildklierandoeningen, die voor endocrinologische functietesten waren opgeroepen, werd direct na het aanleggen van de canule in de vene, bloed verzameld zonder dat er werd gespoeld met fysiologisch zout of een heparine-oplossing. Na afname van 5 ml bloed, dat niet voor analyse werd gebruikt, werden snel achter elkaar standaard Vacutainer (Becton & Dickinson B.V., Leiden, Nederland) buizen zonder en met lithiumheparine (15 u.s.p. eenheden/ml) gevuld en gemengd. Serum en plasma werden na 1 uur staan bij 18-22 °C bereid door centrifugeren bij dezelfde temperatuur en overgeschonken in polystyreen buisjes.

Een deel van het serum en plasma werd direct hierna ingevroren bij -18 tot -22 °C.

Een ander deel van het heparinebloed, plasma en serum werd gedurende 3 dagen afgesloten bewaard bij 18-22 °C. Het effect van bewaren van de verschillende materialen op de FT4-concentratie werd gemeten met

Delfia FT4 3-staps-bepaling (EG&G Wallac, Turku, Finland).

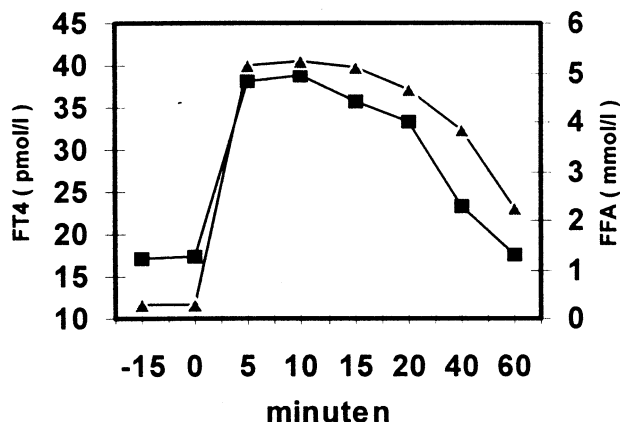
Effect van heparine uit het afnamesysteem

Een gezonde vrijwilliger nuttigde 1 uur vóór bloedafname een maaltijd waarin 200 gram boter was verwerkt. Hiermee steeg de plasma triglyceride-concentratie tot 3 mmol/l (referentiewaarden 0.5 - 2.0 mmol/l).

Bij de proefpersoon werd in een armvene een Venflon canule ingebracht waaraan een Connecta-slot werd aangesloten. Bloed werd afgenomen in standaard Vacutainerbuizen met en zonder 15 u.s.p. eenheden heparine/ml. Nadat het afnamesysteem was gespoeld met 1 ml fysiologisch zout werd 15 minuten gewacht voor de tweede bloedafname. Daarna werd (t = 0 min) 4 ml van een in fysiologisch zout verdunde heparine-oplossing toegediend (totaal 2000 IE heparine Leo). Bloed werd afgenomen na 5, 10, 15, 20, 40 en 60 minuten via het aangelegde afname systeem, waarbij nu werd gespoeld met telkens 1 ml fysiologisch zout. Bloed werd verzameld en verwerkt in standaard Vacutainerbuizen zonder toevoegingen. Het serum werd direct ingevroren bij -18 tot -22 °C. FT4 werd na 2 weken gemeten met de Delfia FT4 3-staps-methode. Vrije vetzuren werden na 4 weken bepaald in serum m.b.v. een enzymatisch colorimetrische bepaling (Nefac, Waco Chemicals, USA).

RESULTATEN

Tabel 1 toont de FT4-concentraties, die werden gevonden wanneer heparinebloed, heparineplasma en serum werden bewaard bij 18-22°C. De gevonden FT4-concentraties van plasma en serum na gedurende



Figuur 1. De invloed van spoeling van het bloedafname-systeem met heparine bevattende spoelvoelstof op de meting van vrije vetzuren (FFA, driehoeken) en FT4 (blokken) in serum. Op t=0 minuten werd met 2000 IE heparine gespoeld.

Laboratorium Endocrinologie en Radiochemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Correspondentie: Dr. J.L.M.L. van Rijn, Laboratorium Endocrinologie en Radiochemie, F2-207, Academisch Medisch Centrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.

Ingekomen: 07.12.98

Tabel 1. Effect van 3 dagen bewaren van serum, heparineplasma en heparinebloed bij 18-22 °C op de FT4-concentratie. Materiaal werd afgenomen bij 8 patiënten. Significantie van verschillen t.o.v. direct ingevroren serum werd bepaald met de gepaarde t-test.

	FT4 gemiddelde (pmol/l)	range (pmol/l)	
Serum direct ingevroren	12,5	(9,4 - 15,7)	
Heparineplasma direct ingevroren	12,4	(9,6 - 15,5)	p = 0,227
Serum bewaard bij 18°C-22°C	12,7	(9,3 - 15,8)	p = 0,178
Heparineplasma bewaard bij 18°C-22°C	12,9	(9,9 - 16,0)	p = 0,187
Heparinebloed bewaard bij 18°C-22°C	13,3	(9,9 - 16,2)	p = 0,001

3 dagen bewaren bij kamertemperatuur, lieten geen significante verschillen zien t.o.v. de waarden die werden gevonden met direct ingevroren materiaal.

Alleen na het bewaren van gehepariniseerd bloed werd een geringe, doch significante toename in FT4-concentratie gevonden. Het leek ons niet aannemelijk dat het gebruik van gehepariniseerde afnamebuizen of de verwerkingstijd van het afgenomen bloed in onze setting (minder dan 2 uur) de eerder waargenomen hoge FT4-concentraties kon verklaren.

Daarom concentreerden wij ons op het heparine in het afnamesysteem dat voor de endocrinologische functietesten werd gebruikt. Figuur 1 laat zien dat, binnen 5 minuten na het spoelen van het afnamesysteem met de heparine-oplossing, de concentraties van de vrije vetzuren en FT4 sterk stegen en vervolgens weer afnamen.

Discussie

In vivo toegediend heparine leidt tot de vrijmaking van lipoproteïne-lipase en hepatisch lipase uit de vaatwand (1,2). Het lipase kan de productie van vrije vetzuren op gang brengen, mits er voldoende triglyceride als substraat aanwezig is (2); in ons geval werd de plasma triglyceride concentratie van de vrijwilliger omhoog gebracht tot 3 mmol/l door het nuttigen van een vetrijke maaltijd. Verhoogde vrije vetzuren kunnen de competitie aangaan met de bindingsplaatsen van thyroxine aan thyroxine-bindend-globuline, albumine en thyroxine-bindend-préalbumine (3), waardoor T4 vrij komt te circuleren en in de analyse een verhoogd vrij T4 wordt gevonden.

Heparine dat wordt toegediend ter bestrijding van intravasale stolling kan leiden tot verhoging van de ex vivo FT4-concentratie (2,3,4). Dat het spoelen van het afname-systeem met een "beetje" van een heparine oplossing ook kan leiden tot eenzelfde verhoging van de FT4-concentratie is vaak nog onbekend.

Referentiemethoden zoals directe evenwichtdialyse, symmetrisch dialyse of ultrafiltratie zullen deze FT4-verhoging door vrije vetzuren meten. Er bestaat zelfs een positieve correlatie tussen de concentratie van vetzuren en van de gemeten FT4 (1,5,6,7). De door ons gebruikte Delfia FT4-methode verloopt volgens het principe van terugtitratie en vertoont een zelfde correlatie.

Het effect van vrije vetzuren kan tegengegaan worden door de toevoeging van albumine aan de assay-buffer (8). Vetzuren zullen zich hieraan binden, waarna het verdrongen (vrije) T4 zal binden aan de oorspronkelijke eiwitten.

Analyse methoden die gebruik maken van albumine (9) in de assay-buffer zullen het door ons waargenomen fenomeen c.q. deze reële FT4-verhoging niet meten.

Conclusie

Heparine-plasma en serum kunnen tenminste drie dagen worden bewaard bij kamertemperatuur zonder dat dit effect heeft op de FT4-concentratie. In bloed dat in vitro is gehepariniseerd wordt na drie dagen een kleine doch statistisch significante stijging van de FT4-concentratie gevonden. Spoelen van het afname systeem met een lage dosis van een heparine-oplossing kan leiden tot een verdubbeling van de FT4-concentratie. Daarom is het gebruik van heparine om het bloedafname systeem open te houden sterk af te raden voor analyse van FT4.

Literatuur

- Mendel CM, Frost PH, Kunitake ST, Cavalieri RR. Mechanism of the heparin-induced increase in the concentration of free thyroxine in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 1259-1264.
- Jaume JC, Mendel CM, Frost PH, Greenspan FS, Laughton CW. Extremely low doses of heparin release lipase activity into the plasma and can thereby cause artifactual elevations in the serum-free thyroxine concentration as measured by equilibrium dialysis. *Thyroid* 1996; 6: 79-83.
- Chopra IJ, Huang T-S, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN. Serum thyroid hormone binding inhibitor in nonthyroidal illnesses. *Metabolism* 1986; 35: 152-159.
- Stevenson HP, Archbold PR, Johnston P, Young IS, Sheridan B. Misleading serum free thyroxine results during low molecular weight heparin treatment. *Clin Chem* 1998; 44: 1002-1007.
- Faber J, Waetjen I, Siersbaek-Nielsen K. Free thyroxine measured in undiluted serum by dialysis and ultrafiltration: effects of non-thyroidal illness, and an acute load of salicylate or heparin. *Clin Chim Acta* 1993; 223: 159-167.
- Csako GS, Zweig MH, Glickman J, Kestner J, Ruddel M. Direct and indirect techniques for free thyroxin compared in patients with nonthyroidal illness. Effect of free fatty acids. *Clin Chem* 1989; 35: 102-109.
- Sapin R, Schliener JL, Grunenberger F, Gasser F, Chambon J. In vitro and in vivo effects of increased concentrations of free fatty acids on free thyroxin measurements as determined by five assays. *Clin Chem* 1990; 36: 611-613.
- Mendel CM, Frost PH, Cavalieri RR. Effect of free fatty acids on the concentration of free thyroxine in human serum: the role of albumin. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 1394-1399.
- Blerk M van, Smits J, Rozenski E, Mees M, Roelandt P, Laermans L, Callewaert, Steirteghem AC van. Four radioisotopic immunoassays of free thyroxine compared. *Ann Clin Biochem*; 1996; 33: 335-343.