

Tekrarlayan Düşük ve İntrauterin Ölüm Olgularında Antifosfolipid Antikorların Araştırılması (*)

Hale ARAL (**), İncihan OCAKOĞLU (***), Canan GÖKÇEN (****)

ÖZET

En az iki kez ve üzerinde tekrarlayan düşük ve ölüm doğum hikayesi olan, yaşları 19-49 arasında değişen, 45 kadın hasta grubumuzu oluşturdu; en az bir kez canlı doğum yapmış olan 30 sağlıklı kadın kontrol grubumuzu oluşturdu. Kardiyolipin, fosfotidil serin, fosfotidik aside karşı antifosfolipid antikorları (APA; Ig G, Ig M, Ig A tipi), ELİSA (Stago) metoduyla araştırdık. Hastalarda APA prevalansını % 49 oranında pozitif olarak bulduk. Daha geniş hasta gruplarında çalışılması önerilir. Standart APTT testi ile lupus antikoagülanının araştırılması güvenilir değildir.

Anahtar kelimeler: Antifosfolipid antikorlar, düşük, lupus antikoagülanı

SUMMARY

Research of Antiphospholipid Antibodies in Patients who had Recurren Abortus and Intrauterin Death

45 women, aged between 19-49, who had at least twice or more recurrent abortus and intrauterin death made up our patient group; 30 healthy women who had at least one living birth made up our control group. We studied antiphospholipid antibodies (APA; Ig G, Ig M, Ig A types) mixed of antibodies against cardiolipin, phosphotydl serin, phosphotidic acid using ELISA (Stago) method. We found prevalence of APA positivity % 49 in patients. It is recommended to study in bigger, similar patient groups. Searching for lupus anticoagulants by using standard APTT test is not so reliable.

Key words: Antiphospholipid antibodies, abortus, lupus anticoagulant

Arka arkaya iki veya daha fazla düşük olması halinde tekrarlayan düşüklerden bahsedilir (1). Etiyolojinin belirlenemediği olgularda, immünolojik faktörler ve bazı genetik olayların sorumlu olabileceği düşünülmektedir (2).

Antifosfolipid antikorların varlığı, sistemik lupus eritematosum (SLE) olan kadınlarda fetal kayıp riskini gösterir (3). Orta veya yüksek düzeyde antifosfolipid antikorların arter trombozu, ven trombozu, tekrarlayan fetal kayıp veya trombositopeni ile ilgili oluşu Antifosfolipid Antikor sendromu olarak bilinir. Sendrom, SLE veya ilgili bir otoimmün hastalığı olanlarda sıklıkla görülür. Otoimmün bozukluğun gösterilmediği olgularda, bu antikorların bulunması "Primer Antifosfolipid Antikor Sendromu" tanısını koydurur (4).

SLE'a ait bulguları görülmediği halde lupus antikoagülanları bulunabilen olgularda, bazı ciddi trombotik olayların ortaya çıktığı gözlenmektedir. Sistemik düzeyde

oluşan bu değişikliklerin gebeliğin devamında esas rol oynayan utero-plasental üniteye meydana gelmesi durumunda gebeliğin olumsuz şekilde etkilenmesi kaçınılmazdır; plasental yatakta olası bir trombotik olay fetüs kaybına neden olmaktadır (2). Bu antikorların bulunduğu gebe kadınlarda spontan düşük, ölü doğum, intrauterin gelişme geriliği, erken doğum, arter ve ven trombozu meydana gelebilmektedir. Bu antikorlar, gebelikler arası normal zamanlarda azalabilir veya kaybolabilir ve bir sonraki gebelikte artan aktivite göstererek, fetüs kaybına neden olabilir (5).

Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) çalışması, koagülasyonun intrinsek sistemini analiz etmek amacıyla uygulanır. In vitro fosfolipid bağımlı koagülasyon reaksiyonlarını (*protrombinin trombine çevrilmesini*) inhibe eden antikorlar lupus antikoagülanlarıdır. Bu inhibitör aktivitenin, bu antikorların antijenik özellikleriyle direkt ilişkili olduğu düşünülmektedir.

24. Ulusal Hematoloji Kongresinde (11-14 Nisan, 1996. İstanbul) poster olarak sunulmuştur.*; SSK Göztepe Eğitim Hastanesi Klinik Biyokimya Asist. Dr.**; Klinik Biyokimya Şef Muavini***; Kadın-Doğum Kliniği Uz. Dr.****

Antifosfolipid Antikor Sendromu'nun klinik görünüm-lerinin değişkenliğinin temelinde ne olduğu anlaşılama-mıştır; neden bazı hastaların ven trombozu, bazılarının arter trombozu, bazılarının trombositopeni, bazılarının fetal kayıp veya bunların bileşimini sergilediği açık-lanamamıştır. Görüldüğü gibi, ortada paradoks bir du-rum vardır; antifosfolipid antikorların in vitro anti-koagülan etkisi olduğu halde, in vivo trombozla ilgili olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

Bu araştırmayla, tekrarlayan düşük ve intrauterin ölüm meydana gelmiş olgularda antifosfolipid antikor (APA)'ların pozitifliğinin prevalansını araştırdık.

MATERYAL ve METOD

Hasta grubunu oluşturan 45 kadın, doğuran yaş grubunda olduğu halde, en az iki kez ve daha fazla düşük (veya ölü doğum) yapmış olup, bu şikayetle SSK Göztepe Eğitim Has-tanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği İnfertilite Polikliniği'ne başvurup, sekonder infertilite tanısıyla izlenmekteydi. Aynı yaş grubunda, hiçbir klinik şikayet ve bulgusu olmayan, hiç düşük yapmamış ve en az bir adet sağlıklı ço-çuğu olan 30 kadın, kontrol grubunu oluşturdu. Her kadından kısaca sis-temik ve obstetrik öykü alarak, genel fizik muayenesi yapılarak, hasta bilgi formu dolduruldu.

Klinik muayene ve rutin analizlerle hastalarda karaciğer-böb-rek fonksiyonları değerlendirildi. Bu amaçla; serumda glukoz, üre, kreatinin, ürik asit, SGOT, SGPT, LDH, ALP, protein, albumin, RA-XT otoanalizöründe çalışıldı. Merkez Bakteri-yoloji Laboratuvarı'nda kan sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı, VDRL (lam aglutinasyonu), anti-DNA (lam aglutinasyo-nu), APTT (koagülometreye) çalışıldı.

Sabah aç karınla alınan kan örneğinden 4.5 ml kadarı, 0.5 ml 0.109 M (% 3.2'lik) trisodyum sitrat bulunan tüpe koyularak; 2500 g (10 dakika) santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnek-leri -20°C'de bir ay süreyle dondurularak saklandı. Kardiyoli-pin, fosfotidik asit, fosfotidilserinden oluşan fosfolipid karışımına karşı olan IgG, IgA, IgM tipi antifosfolipid antikor-ların (APA) düzeyi ELISA metodu (Stago, Fransa) kulla-nılarak ölçüldü.

BULGULAR

Olguların hiç birisinde SLE, infeksiyon, allerji dü-şündürebilecek belirli bir klinik bulguya rastlanmadı (Tablo 1).

100 PL ünite/ml'ye kadar lineeritenin gözlendiği çalışma sonucunda antifosfolipid antikorların düzeyi, 5 PL ünite/ml altında bulunması durumunda APA (-) olarak kabul edilirken; 5-15 PL ünite/ml arasında bulu-nanlar düşük düzeyde (sınırdan) APA (+); 15 PL ünite

Tablo 1. Olgularda yaş ortalaması, APA pozitifliği, APTT uzama-sı vb bulguların istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	Kontrol (n=30)	Hasta (n=45)	Karşılaştır.
Yaş ortalaması	33.93±3.39	29.95±6.31	p>0.05
APA pozitif olgular (n)	3 (% 10)	22 (% 49)	p<0.0001
St. APTT (>40 sn) (n)	3 (% 10)	6 (% 13)	p=0.36
anti-n DNA pozitif olgu (n)	0	1 (% 2)	p>0.05
VDRL pozitif olgu (n)	0	0	

Tablo 2. APA (-), APA (+), APA (++) olan hastalarda APTT süre-si, düşük sayısı ve düşük gebelik haftası ortalamaları.

	APA (-)	APA (+)	APA (++)
APTT N (n)	20 (% 44)	17 (% 38)	2 (% 4)
APTT > 40 sn. (n)	3 (% 6)	2 (% 4)	1 (% 2)
Düşük sayısı ort.	3.39±1.69	3.0±1.63	4.66±3.05
Düşük gebelik haftası ort.	11.52±3.42	13.10±6.63	10.33±4.93

/ml üzerinde bulunanlar orta düzeyde APA (++) olarak değerlendirildi. Hasta grubu incelendiğinde, APA varlığı ile APTT uzaması arasında bir ilişki bulunamadı (r=0.07, p=0.50).

APA (++) olan hasta grubunun düşük sayısı ortalaması, APA (+) olan hasta grubunkinden ve APA (-) olan hasta grubunkinden yüksekti. Buna karşılık, plazma-da APA pozitifliği ile düşük sayısı arasında bir ilişki bulunamadı (r=0.04, p=0.76) (Tablo 2). Hastaların % 71'inde gözlenen ilk trimestir düşüğü olmasıydı. APA (++) olan hasta grubunun düşük haftası ortalaması, APA (+) olan hasta grubunkinden ve APA (-) olan hasta grubunkinden düşüktü.

TARTIŞMA

Biz kardiyolipin, fosfotidik asit, fosfotidilserinden oluşan fosfolipid karışımına karşı oluşan IgG, IgA, IgM tipi antifosfolipid antikorların düzeyini ELISA ile ölçtük. Sadece antikardiyolipin antikorları saptayabilen çalışmalara göre bu kitin özgüllüğü ve duyarlılığı daha yüksektir (6). Çalışmamızda antifosfolipid antikor poziti-flliği, 30 kişilik kontrol grubunda % 10 olarak, iki kez ve üzerinde düşük yapan 45 kadından oluşan hasta grubunda % 49 olarak bulundu.

Parazzini ve ark.'nın, tekrarlayan düşük hikayesi olan 220 kadın, 193 kontrol ile yaptıkları bir çalışmada ACA IgG, ACA IgM pozitifliği hasta grubunda % 19, kontrol grubunda % 3 olarak bulundu (7). Creagh ve ark.'nın,

aynı şikayetleri olan 35 kadın hasta ile yaptıkları çalışmada, ACA IgG pozitifliği % 17 oranında bulundu (8). Mac Lean ve ark.'nın, 243 hasta ile yaptıkları benzer çalışmada ACA pozitifliği % 10.2 oranında gözlemlendi (8). Unander ve ark.'nın, en az 3 kere ve üzerinde düşük yapmış 99 İsveç'li kadının % 42'sinde yüksek antikardiyolipin antikor düzeyi belirlendi (7). Patrassi ve ark.'nın, düşük yapmış olan 64 kadın üzerinde yaptıkları çalışmada antikardiyolipin antikor pozitifliği % 48.4 olarak bulundu (9). ABD.'de yapılan benzer bir çalışma sonucunda, ACA pozitifliği % 50 oranında bulundu (9). Görüldüğü gibi değişik grupların hesapladıkları ACA prevalansı, birbirinden oldukça farklıdır.

Matsuda ve ark. tarafından, ARA tanı kriterlerine göre SLE tanısı almış olan 50 hastada ve 20 kişiden oluşan kontrol grubunda LA ve antifosfolipid antikorlarının düzeyleri araştırıldı. Hasta grubunda antikardiyolipin antikor % 32, antifosfolipid a. % 26, antifosfolipidinositol a. % 12 ve antifosfolipidik asit a. % 14 oranında pozitif bulundu. Hastaların % 44'ünde bu antikorlardan en az biri pozitif olarak kaşımıza çıkmaktadır (10). Bu antikorların IgG, IgA, IgM izotiplerinden biri antifosfolipid antikor sendromunda gözlenebilmektedir (5,11).

APTT reaktifleri içinde bir aktivatör ve bir de fosfolipid kaynağı bulunur. Fosfolipidin konsantrasyonu, elde edildiği kaynak ve konfigürasyonu, lupus antikoagülanlarının (LA) varlığını gösterecek duyarlılıkta reaktifin belirlenmesinde önemlidir (12). APTT sonuçlarını etkileyen analitik nedenler içinde reaktifin plazmayla inkübasyon süresi önemli bir değişkendir. Belli bir ticari APTT reaktifi için inkübasyon süresi, üretici firma tarafından belirlenmiş olup; testin kullanım amacı her ne olursa olsun, genellikle sabittir. Annie Robert ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, inkübasyon süresinin 1 dk'dan 10 dk'ya çıkarılmasıyla APTT sonuçlarının kısaldığı bazı durumlar gözlemlendi, bu durumlardan biri de LA pozitif olan plazmalardı. Bunun nedeni, lupus antikoagülanının APTT fosfolipidleriyle zamana dayalı kısmi nötralizasyonu olabilir; fosfolipidlerin konsantrasyonu artırıldığında, LA nötralizasyonu sağlandığı iyi bilinmektedir. Kullanılan APTT reaktifi LA'na duyarlıydı. Bir dakika inkübasyon uygulandığında, bulunan APTT sonucundan, 10 dakika inkübasyon uygulanarak bulunan APTT sonucu çıkarıldığında, "1-10 APTT" testi diyebileceğimiz değerler elde edildi. Normalde bu fark 11 saniyenin altında olması gerekiyorken, 11 saniyenin üzerinde bulunan test değerleri LA pozitif hastaları gös-

teriyordu (13).

SSC (Scientific and Standardization Comitee) alt komitesinin lupus antikoagülanlarının standardizasyonu ile ilgili yaptığı toplantı sonucunda aldığı bazı kararlara göre, çoğu laboratuvarın kullandığı APTT testi, lupus antikoagülanının araştırılmasında özgül ve duyarlı değildir. LA taraması amacıyla KCT (*kaolin pıhtılaşma zamanı*), dRVVT ("*diluted Viper Venom Time*", *fosfolipid konsantrasyonu düşürülür ve fosfolipid konsantrasyonu artırılarak, inhibe edilir*), TTI (*doku tromboplastin inhibisyon testi*), modifiye edilmiş (*lupus antikoagülanına duyarlılığı artırılmış*) APTT önerilebilir. Yüksek hızlı santrifüjler (5000 g, 10 dakika) veya filtreler kullanılarak plazmaların trombositlerden iyice arındırılmaları sağlanmalıdır. LA çalışılacak plazma trombositlerden ne kadar arındırılırsa, testin duyarlılığı o kadar artırılmış olur. Çünkü, trombositlerin membranında bulunan fosfolipidler interferansa neden olur. Bu alt komite lupus antikoagülanının tanısı için bazı kriterler belirlemiştir (14).

Lupus antikoagülanları heterojen olup, en az iki farklı fosfolipide bağlanan plazma proteinlerine karşı otoantikorlar içerir. Önceleri, LA çalışmalarının anyonik fosfolipidlere karşı olan antikorları saptadığı düşünülmekteydi. Saflaştırılmış kısımların kullanıldığı protrombinaz çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre belli bazı lupus antikoagülanları "fosfolipide bağlı protrombin" veya "β2 GPI" için spesifiktir (4).

Antifosfolipid antikorlar; lupus antikoagülanı (LA), antikardiyolipin antikor (ACA) çalışmaları, sifilize özel serolojik testlerle (VDRL) ortaya çıkarılabilen antikorlardır. LA çalışmasında olduğu gibi, ACA çalışmasında (ELISA) saptanabilen antikorlar heterojendir ve hem kardiyolipine karşı hem de kardiyolipine bağlı proteinlere karşı antikorları içerir (4). Kardiyolipin, mitokondrinin içteki membranında bulunur; fosfat taşınmasında, sitokrom oksidaz aktivitesinde görev alır (15). Kardiyolipinden başka fosfolipidik asit, fosfolipidlerin gibi diğer anyonik fosfolipidlerin karışımından yararlanılarak hazırlanan antijenler sayesinde bütün bu fosfolipidlere bağlanan proteinlere karşı antikorların saptanması sağlanabilir (16). Bu fosfolipidler hücre membran yapısında yer alırlar (17).

Özetle, fosfolipidlere (*kardiyolipin, fosfolipidik asit, fosfolipidlerin, vb.*) bağlanan proteinler ve/veya protein-

fosfolipid kompleksleri, antifosfolipid antikorların hedefleri olarak bilinmekte olup ACA, LA çalışmalarında bu proteinlere karşı otoantikörlerin varlığı saptanmaya çalışılmaktadır. Hastaların bazısında ACA ve LA'ndan biri bulunup, diğeri bulunmadığı halde, bazı hastalarda ACA ve LA aynı antikor topluluğu olarak bulunabilir.

Lockwood ve ark., 737 hasta ile yaptıkları bir çalışma sonucunda APTT uzamasının düşük yapma riskini göstermede duyarlılığı düşük ancak özgüllüğü yüksek bir test olduğunu buldular (10). Tunçay ve ark.'nın, 30 kadın ile yapmış olduğu bir çalışmada APTT uzaması (>40 sn) % 16.6 oranında bulundu (2). Bizim çalışmamızda, kontrol grubunda APTT uzaması görülenler % 10, hasta grubunda % 13 olarak gözlemlendi, iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı; ayrıca APA pozitifliği ile uzamış standart APTT testi arasında bir ilişki bulunamadı. Lupus antikoagülanlarının hipertansiyon, hemolitik anemi, çeşitli tümöral oluşumlar ve bazı ilaçlarla ilgisi olabileceği bilinmektedir. Olgular arasında bu ilaçlardan herhangi birisini kullanan yoktu.

İlk olarak Laurell ve ark. yalancı pozitif VDRL testi ile lupus antikoagülan aktivitesi arasındaki ilişkiyi gösterdiler (5). VDRL testinde kardiyolipin (anyonik) ve fosfotidilkolin (nötral) fosfolipidlerin karışımı (*beraberinde kolesterol bir bağlayıcı olarak*) kullanılır. Bizim çalışmamızda APA pozitif olguların hiç birisinde yalancı pozitif VDRL görülmedi.

Kardiyolipin molekülüyle DNA çatası arasındaki benzerlikler nedeniyle, bazı monoklonal antikorların kardiyolipin ve diğer fosfolipidlere bağlandığı gibi, DNA gibi polinükleotidlere de bağlandığı görülmüştür. Monoklonal antikorlarla ilgili olan bu gözlemler poliklonal (serum kaynaklı) antikorlar ile yapılan çalışmalarla desteklenmedi. Bazı gruplar hasta serumlarındaki APA ve DNA'ya (tek veya çift sarmallı DNA) karşı olan antikorlar arasında çapraz reaksiyon bulurken, bazıları bulamadı. SLE'da APA ve anti DNA antikorları benzer yabancı antijenlere cevap olarak ortaya çıkmış olabilir (18). APA orta düzeyde pozitif (>30 PL ünite/ml), anti-n DNA (lam aglütinasyonu) pozitif olan bir hasta geçirilmiş felç hikayesiyle, ayrıca otoimmün hastalığın da olabileceğini düşündürdü. Bunun dışında APA pozitif olgularda kros reaksiyona bağlı anti-n DNA pozitifliğine rastlanmadı.

Sonuç olarak, dünyada değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda tekrarlayan düşük ve ölü doğum hikayesi olan kadınlarda ACA pozitifliği ile ilgili sonuçlar birbirinden oldukça farklıdır. Plazmanın elde edilmesi, depolanması, kullanılan reaktiflerin kaynağı ve metodla ilgili farklılıklar sonucu etkilemektedir; ticari kitlerin standardizasyon çalışmaları devam etmektedir. Bizim bulduğumuz APA pozitifliğinin prevalansı % 49'dur. Bu sonuç bazı araştırmacılarınkiyle uyumludur. Hasta grubunda APA pozitifliği ile standart APTT pozitifliği (>40 sn.) arasında bir ilişki bulunamamıştır. Tekrarlayan düşük yapanlarda LA araştırılırken koagülasyon metoduna dayanan standart APTT testinin güvenilir olmadığı gösterilmiştir. ELISA metodu daha az özgül antikor topluluğunu taradığı halde, günümüzde daha güvenilir bir tarama testi olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Erenus M: Habitüel abortus ve nedenleri. İstanbul Jinekoloji Derneğinin düzenlediği mezuniyet sonrası eğitim kursu, Kasım 1995.
2. Tunçay YA: Habitüel abortus ve mükerrer intrauterin ölüm olgularında lupus antikoagülanının yeri. Seri sekreterlik, İstanbul, 1990, 21.
3. Parke AL, et al: The thrombotic diathesis associated with the presence of phospholipid antibodies may be due to low levels of free Protein S. The American Journal of Medicine 93:49, 1992.
4. Roubey RAS: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other antiphospholipid autoantibodies. Blood 84(9):2854, 1994.
5. Brown HL: Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. Clinical Obstetrics and Gynecology 34:17, 1991.
6. Macworth-Young C: Antiphospholipid antibodies: more than just a disease marker? Immunology today 11(2):60, 1990.
7. Parazzini F, et al: Antiphospholipid antibodies and recurrent abortion. Obstetrics and Gynecology 7(6):854, 1991.
8. Mac Lean MA, et al: The prevalence of lupus anticoagulant and anti-cardiolipin antibodies in woman with a history of first trimester miscarriages. British Journal of Obstetrics and Gynecology 101:103, 1994.
9. Patrassi GM, et al: Fibrinolytic pattern in recurrent spontaneous abortions. American Journal of Hematology 47:266, 1994.
10. Matsuda J, et al: Plasma concentration of total/free and functional protein S are not decreased in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or antiphospholipid antibodies. Annual Hematology 69:311-315, 1994.
11. Yron I, et al: A human monoclonal Ig A autoantibody-185/12-behaves like an autoimmune antiphospholipid antibody. Clinical and Experimental Immunology 97:187, 1994.
12. Triplett DA: Coagulation assays for the lupus anticoagulant: Review and critique of current methodology. Stroke 23(2):11, 1992.
13. Robert A: Two different incubation times for the activated partial thromboplastin time (APTT): A criterion for diagnosis of lupus anticoagulant. Thrombosis and Haemostasis 7(2):220, 1994.
14. Exner T, et al: Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thrombosis and Haemostasis 65(3):320, 1991.
15. Murray RK, et al: Harper's Biochemistry, Appleton and Lange 23rd Ed. East Norwalk, 1993, 244.
16. Gilman-Sachs A, et al: Patterns of anti-phospholipid antibody specificities. Journal of Clinical Laboratory and Immunology 35:83, 1991.
17. Murray RK, et al: Harper's Biochemistry, Appleton and Lange 23rd Ed East Norwalk, 1993, 146.
18. Gouault-Heilmann M, et al: Inherited protein S deficiency. Thrombosis Research 76(3):277, 1994.