

Tekrarlayan Gebelik Kaysplarında Lupus Antikoagülan Antikorun Yeri

LUPUS ANTICOAGULANT ANTIBODIES IN CASES
WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

Sedat KARAOSMANOĞLU, Yalçın YILMAZ, Deniz KÖSE,
İzzet YÜCESOY, Nurettin SERİNKAN, Coşkun BAYSAL

Zeynep Kamil Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İSTANBUL

ÖZET

Amaç: Tekrarlayan gebelik kayıplarında immünolojik faktörlerden Lupus Antikoagülan Antikor pozitifliğinin araştırılması ve bu araştırmada nasıl bir yöntem uygulanacağına belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: Zeynep Kamil Hastanesi, İstanbul

Materyal ve Metod: Tekrarlayan gebelik kayıpları olan 40 olgu ve kontrol grubu olarak bir yada iki doğumu olan hiç düşüğü olmayan ve son trimesterde başvuran 20 gebede Lupus Antikoagülan Antikoru araştırıldı. Lupus Antikoagülan Antikoru tespit etmek için tarama testi olarak APTT ve spesifik test olarak da PNP kullanıldı. Her iki grubun sonuçları karşılaştırıldı.

Bulgular: Tekrarlayan gebelik kayıpları olan 40 olgunun üçünde APTT değerleri uzamış olarak bulunurken (% 7.5), kontrol grubundaki hiç bir olguda APTT değerlerinde uzama tespit edilmemiştir (%0.0). Uzamış APTT değerlerine sahip olgulara PNP-APTT ve Şalin APTT prosedürleri uygulandığında APTT değerlerinde belirgin kısalma olduğu, normal APTT'li tekrarlayan gebelik kayıpları olan olgularda ve kontrol grubunda PNP-APTT testini uyguladığımızda sonuçlarda hiç bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç: Sebepi açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları olan olgularda immünolojik faktörlerden Lupus Antikoagülan Antikor araştırılması başarı şansını yükseltecektir. Pahalı ve zaman alıcı bir test olan PNP'nin spesifik bir test olarak bilinmesi ve sadece uzamış APTT'li olgulara uygulanması, APTT'nin ise bir tarama testi olarak tüm açıklanmamış tekrarlayan gebelik kayıpları olgularına uygulanması yerinde bir karar olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan gebelik kayıpları,
Lupus Antikoagülan Antikoru,
APTT, Şalin APTT, PNP

T Klin Jinekoloj Obst 1995, 5:244-248

Geliş Tarihi: 01.11.1994

Yazışma Adresi: Sedat KARAOSMANOĞLU
Zeynep Kamil Hastanesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği,
İSTANBUL

SUMMARY

Objective: Detection of Lupus Anticoagulant Antibodies as an immunologic factor in cases with an history of recurrent pregnancy loss and determination of the priority of the laboratory methods in this investigation.

Institution: Zeynep Kamil Maternity Hospital, Istanbul

Materials and Methods: Lupus Anticoagulant Antibody was investigated in the sera of 40 cases with an history of recurrent pregnancy loss and as a control group in 20 third trimester pregnancies with one or two deliveries but no abortions. APTT test was used for screening and PNP as a specific test. Results of both groups were compared.

Results: As the APTT results were found to be prolonged in 3 of the 40 cases with an history of recurrent pregnancy loss (7.5%), APTT results of all cases in the control group were found to be in the normal range (0,0%). PNP-APTT and Saline APPT procedures were determined in cases with prolonged APTT results and marked changes were observed as no differences in the results were observed in recurrent pregnancy loss cases with normal APTT results and in the control group when the PNP-APTT test was used.

Conclusion: Investigation of Lupus Anticoagulant Antibody in unexplained cases of recurrent pregnancy loss will optimize the success rate. It is a good policy to use the APTT test as a screening method in all cases of unexplained recurrent pregnancy loss and reserve the expensive and time-consuming PNP test as a specific test for cases with prolonged APTT results.

Key Words: Recurrent Pregnancy Loss,
Lupus Anticoagulant Antibody,
APTT, Saline APTT, PNP

T Klin J Gynecol Obst 1995, 5:244-248

Son yıllarda tekrarlayan düşüklerin etyolojisinde otoimmün hastalıklar ve genel olarak immünolojik sistem giderek önem kazanmıştır. Etyolojisi bilinmeyen ya da açıklanamayan birçok olguda ileri tetkiklerle değişik tipte otoantikolar saptanmaktadır. Bu otoantikoların en önemlileri lupus antikoagülan antikoru ve antikardiolipin

Tablo 1. Habitüel abortus ve kontrol grubunda uzamış APTT sonuçları

Table 1. Prolonged APTT results in habitual abortion and control group cases.

	Habituel abortus grubu	Kontrol grubu
APTT	3/40	0/20
Oran (%)	7.50	%0,00

antikoru olup antifosfolipid antikoru başlığı altında incelenirler (1,2)

Antifosfolipid antikoru ile ilgili en ilginç fenomen fetal kayıplardır. İlk kez Nilsson ve arkadaşları 1975 yılında yayınladıkları bir raporda genç bir kadında ardışık üç düşükten ve lupus antikoagülanı pozitifliğinden bahsetmişlerdir. Bu çalışmadan sonra lupus antikoagülanı ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasındaki bağlantıyı gösteren çok sayıda olgu raporları ve küçük seri çalışmalar yapılmıştır (3,4).

Tekrarlayan gebelik kayıplarına yol açtığı düşünülerek immünolojik faktörler başlıca üç grupta incelenir:

1. Eşler arasındaki ortak doku antijenlerinin varlığı

2. Hastaların serumlarında blokan antikoru bulunmaması

3. Hastaların serumlarında lupus antikoagülan antikoru ve antikardiolipin antikoru gibi vücuttaki negatif yüklü fosfolipidlere karşı oluşan antifosfolipid antikoru bulunması (5,6)

Çalışmamızda hem hasta hem de hekim için cesaret kırıcı bir problem olan tekrarlayan gebelik kayıplarında olguların immünolojik değerlendirilmesi amacı lupus antikoagülan antikoru araştırmayı ve bu amaçla yapılacak tetkiklerde izlenecek yolu tartışmayı amaçladık.

MATERYEL VE METOD

1/8/1992-31/5/1993 tarihleri arasında Zeynep Kamil Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran 40 tekrarlayan gebelik kaybı olan olguda ve kontrol grubu olarak, bir ya da iki doğumu olan, hiç düşüğü olmayan ve son trimesterde rutin kontrol amacı ile doğum polikliniğine başvuran 20 gebede lupus antikoagülan antikoru araştırıldı.

Lupus antikoagülan antikoru tespit etmek için tarama testi olarak APTT (Aktive Parsiyel Trombop-

lastin Zamanı) ve spesifik test olarak da PNP (trombosit nötralizasyon prosedürü) kullanılmıştır. Spesifite, geçmişte heparin kullanılmadığı öğrenilerek ve faktör eksikliği (özellikle faktör 8) olmadığı uzamış pıhtılaşma süresinin normal insan plazmasıyla karışım çalışmaları sonucu normale dönmeyişi ile pekiştirilmiştir.

Kan örnekleri 9 birim kan+1 birim 0.13 mol/L trisodyum sitrat şeklinde hazırlandı ve 4000 devir/dakika da 20 dakika santrifüje edildi. Sonuçta elde edilen trombositten fakir plazma -20°C'de donduruldu ve çalışma yapıncaya kadar bekletildi.

Trombosit Nötralizasyon Prosedürü (PNP) için kan bankasından 1 ünite trombosit süspansiyonu alındı. 50 ml'lik trombosit konsantrisine eş miktarda Tris (tris hidroksi metil aminometan) ile tamponlanmış tuzlu solüsyonla karıştırıldı. Elde edilen karışım trombosit konsantrisindeki eritrositleri elimine etmek için 200 devir/dakika 10 dakika santrifüje edildi. Süpernatant (trombositten zengin kısım) plastik bir santrifüj tüpüne transfer edildi. 10 dakika 300 devirde santrifüje edildi. Tekrar trombositten zengin kısım alındı ve içine 10 ml TBS eklendi. 3000 devirde 10 dakika yine santrifüje edildi. Üç kez yıkama prosedürü eklendi. 3000 devirde 10 dakika yine santrifüje edildi. Üç kez yıkama prosedürü tekrarlandı. Sonuçta 1 ml içinde 200000-300000 trombosit olacak şekilde solüsyon hazırlandı.

-20°C'de 3 ml'lik tüplerde dondurularak çalışma yapıncaya kadar bekletildi.

PNP-APTT'nin yapılış şekli: Dondurulmuş olan trombosit süspansiyonu oda ısısında tümüyle eritildi. 0.1 ml APTT belirteci, 0.1 ml sitratlı hasta plazması ve 0.1 ml sitratlı hasta plazması ve 0.1 ml dondurulmuş trombosit süspansiyonu 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 0.1 ml kalsiyum klorür (0.025 mikron) eklendi ve pıhtı formasyonu için gereken süre ölçüldü.

PNP-APTT ile karşılaştırmak için trombosit süspansiyonu yerine 0.1 ml NaCl (0.15 mikron) kullanılarak şalin APTT bakıldı.

BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan 40 tekrarlayan gebelik kayıplı olgu ve kontrol grubunu oluşturan 20 term gebelik olgusu lupus antikoagülan antikoru yönünden

Tablo 2. APTT değerleri uzamış habituel abortus olgularının özellikleri

Table 2. Features of habitual abortion cases with prolonged APTT results.

Yaş	Abortus	APTT (sn)	PNP-APTT (sn)	Salin APTT (sn)	APTT PNP farkı (sn)	Salin APTT PNP farkı
24	3	52	37	42	15	5
31	5	57	44	56	13	12
22	3	71	46	51	25	5

Tablo 3. Habitüel abortus ve kontrol grubu sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması
Table 3. Statistical comparison of habitual abortion cases with the control group.

	APTT (saniye)	PNP-APTT (saniye)	Salin APTT (saniye)	APTT-PNP-APTT (saniye)	Salin APTT-PNP- APTT (saniye)
Habitüel Abortus Grubu Ort. Değeri	31	29,2	29,1	1,55	0,05
Standart sapma	9,103	4,6199	6,6149	4,4603	2,6209
Kontrol Grubu Ortalama Değeri	28,3	28,3	28,15	0	0,15
Standart sapma	2,11299	2,5360	1,7851	2,4494	1,8994
p değerleri	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

Tablo 4. Uzamış APTT'li habitüel abortuslularda, normal APTT'li habitüel abortus ve kontrol grubunun APTT-PNP APTT ve Salin APTT-PNP APTT farklarının karşılaştırılması
Table 4. Indications of investigation for antiphospholipid antibodies in pregnant women.

Ortalama Fark	Uzamış APTT'li Habitüel abortuslar	Normal APTT'li Habitüel abortuslar	Kontrol Grubu
APTT-PNP APTT farkı (saniye)	15 sn	0,46 sn	Osn
Şalin APTT-PNP. APTT farkı (saniye)	7,33 sn	0,7 sn	0,1 sn

Tablo 5. Gebelerin antifosfolipid antikorumları yönünden incelenmesi için gereken endikasyonlar:

Table 5. Indications of investigation for antiphospholipid antibodies in pregnant women.

1. Habitüel abortus ya da fetal kayıplar
2. Konnektif doku hastalıkları
3. Artériel ya da venöz tromboz öyküsü
4. Anormal (uzamış) koagülasyon testleri
5. Pozitif antikor çalışmaları
6. Sıtiliz için serolojik testlerin yalancı pozitifliği
7. Açıklanamayan trombositopeni

teste tabi tutulmuştur. Her iki grupta da APTT ve spesifik test olarak da PNP uygulanmıştır (Tablo 1)

Tekrarlayan gebelik kaybı grubunda 3 kadında APTTdeğerini uzamış olarak bulunmuşken, kontrol grubunda hiç bir kadında APTT değerlerinde uzama tespit edilmemiştir.

Uzamış APTT değerlerine sahip olgulara sırasıyla PNP-APTT ve şalin APTT prosedürleri uygulandığında APTT değerlerinde belirgin bir kısalma olduğu gözlenmiştir. Bu kısalma Bazal APTT ile PNP-APTT karşılaştırıldığında ilk olgu için 15 saniye, ikinci olgu için 13 saniye ve üçüncü olgu için 25 saniyedir.*

Gene bu olgular PNP-APTT ve şalin Af*TT yönünden karşılaştırıldığında şalin APTT ile PNP-APTT arasındaki farkların da sırasıyla 5 saniye. 12 saniye ve 5 saniye olduğu görülür (Tablo 2)

Literatürde Şalin APTT ile PNP-APTT arasındaki fark 5 saniye ve üzerinde ise PNP-APTT arasındaki fark 5 saniye ve üzerinde ise PNP-APTT testi Lupus antikoagülanı için pozitif kabul edilir. Uzamış APTT'yi

üç tekrarlayan gebelik kayıplı olguda bu durumu görmekteyiz. Normal APTT'li tekrarlayan gebelik kayıplı olgularda ve kontrol grubunda PNP-APTT testini uyguladığımızda sonuçlarda hemen hiçbir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Tablo 3)

Tablo 4'de görüldüğü gibi uzamış APTT'li tekrarlayan gebelik kayıplı olgularda PNP testi uygulandığında APTT süresinde çok belirgin oranda kısalma izlenmektedir. Bu değer ortalama 15 saniyedir, salin APTT testi uygulandığında kısalma daha az belirgin olmakta ve APTT, PNP testine göre daha az kısalmaktadır. Sonuçta salin APTT-PNP, APTT farkı ortalama 7.33 saniye olarak bulunmuştur. Bu sonuç da lupus antikoagülanı pozitifliğini teyid etmektedir. (Tablo 4)

Diğer gruplar da APTT, PNP-APTT ve salin APTT testlerine tabii tutulduğunda koagülasyon süresinde anlamlı bir değişme olmamaktadır.

TARTIŞMA

Lupus antikoagülanı ve antikardioiipin antikorumları, negatif yüklü fosfolipidlere karşı oluşan heterojen bir grup antikorun üyeleridir. Eğer bu antikorlardan biri ya da her ikisi de gebe bir kadında tespit edilirse, bu gebe kadında spontan abortus riski, ölü doğum, intrauterin gelişme geriliği, preeklampsi preterm doğum, arteriyel ve venöz tromboz riski artmıştır. Habitüel abortus öyküsü olan kadınların antifosfolipid antikorumları taramalarının yapılması gereklidir. Antifosfolipid antikorumlarının varlığı uygun laboratuvar testlerinin yardımı ile gösterilebilir. Tablo 5'de hangi gebelerin antifosfolipid antikorumları yönünden incelenmesi gerektiği görülmektedir (7). (Tablo 5)

Çalışmamızda lupus antikoagülanı ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında kantitatif ilişki araştırılmıştır.

Tekrarlayan gebelik kayıpları olan gruptaki 40 olgudan 3 tanesinde lupus antikoagülanı pozitif olarak saptanmıştır. Oran %7.5'e tekabül etmektedir. Kontrol grubunu oluşturan 20 olgunun hiçbirisinde lupus antikoagülanı saptanmamıştır. Sağlıklı kadın ya da erkeklerden oluşan bir popülasyonda lupus antikoagülanı görülme sıklığının %1'den az olduğu gözönüne alındığında çalışma grubumuzda bulduğumuz %7.5'lik değer önemli olduğu literatürdeki çalışmalara benzerlik gösterdiği ortaya çıkar (8,9).

Bu çalışmanın sonuçları ABD. Yeni Zelanda ve Avrupa'da elde edilen sonuçlarla korelasyon göstermektedir. Covvchock ve arkadaşları 82 tane iki ya da daha fazla düşüğü olan kadında lupus antikoagülanı pozitifliğini %3 bulmuşken. Edelman ve arkadaşları 120 olguda %10 bulmuştur. Parazzini ve arkadaşlarının 220 habitüel abortus olgusunda bulunduğu lupus antikoagülanı pozitiflik oranı %7'dir (10,11,12).

Gebelik kayıpları, antifosfolipid antikorlu olgularda her safhada olabilmektedir, lupus antikoagülanlı hastalarda herhangi bir trimester düşüğüne özel bir eğilim bulunmamıştır, fetal kayıp birinci, ikinci, üçüncü trimesterde olabilmektedir (13,14). Bizim çalışmamızda da lupus antikoagülanı pozitif hastaların abortusları incelendiğinde birinci ya da ikinci trimestere özel bir afinite olmadığı, her iki trimesterde de yaklaşık eşit sayıda abortus olduğu görülmektedir. Lupus antikoagülanı pozitif üç olgunun toplam düşük sayısı 11 olup, bunların 6 tanesi ilk trimester, 5 tanesi de ikinci trimester düşüğüdür.

Çalışmamızda spesifik test olarak PNP'yi (Trombosit Nötralizasyon prosedürü) kullandık. PNP, spesifik faktör inhibitörlerini lupus tipi inhibitörlerden başarıyla ayırdetmektedir. Bütün lupus antikoagülanı pozitif olgularda PNP testi kullanıldığında uzamış olan APTT'de belirgin oranda kısalma izlenmiştir. Bu kısalma her zaman şalin APTT'dekinden daha fazla olmuştur.

Çalışmamızdaki 3 lupus antikoagülanı pozitif olgu incelendiğinde uzamış olan APTT'ler PNP uygulandığında belirgin derecede kısalma göstermiş ve bu kısalma şalin APTT'dekine göre daha fazla olmuştur.

PNP'nin kesin mekanizması bilinmemektedir, ilk araştırmacılar lupus inhibitörünü göstermenin trombositlerin olduğu ortamda zor olduğunu belirtmişlerdir (15). Daha sonraki çalışmalar lupus inhibitörünün fosfolipidlere karşı oluştuğunu elde etmişlerdir. Thiagarajan ve arkadaşları lupus inhibitörünün fosfolipidlere karşı oluştuğunu elde etmişlerdir. Thiagarajan ve arkadaşları lupus inhibitörü karakterini taşıyan bir monoklonal IgM üzerinde çalışmışlardır. Bu antikorun spesifik fosfolipidlere karşı oluştuğunu ve trombosit membranı varlığında maskelendiğini göstermişlerdir. İnhibitör etki, trombosit yıkım ürünlerince nötralize edilmektedir, ancak sağlam trombositler ya da ekzogen fosfolipidlerin herhangi bir etkisi olmamaktadır (16).

T Klin J Gynecol Obst 1995, 5

Bizim test sistemlerimizde de trombositten fakir plazma kullanılmış ve eğer ortamda bir antikoagülan varlığı söz konusu ise uzamış APTT değerleri elde edilmiştir. Uzamış olan APTT'lerin lupus antikoagülanına bağlı olduğunu göstermek için ortama trombosit eklemek prensibine dayanan PNP testi uygulandığında hastaların koagülasyon değerleri önemli derecede kısalma göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak uzamış APTT değerlerine sahip 3 olguda lupus antikoagülanı varlığı teyid edilmiştir.

Çalışmamızda vardığımız sonuçların birisi de normal APTT değerlerine sahip çalışma grubu hastalar ile kontrol grubu hastalarda bulunan PNP-APTT değerleri bazal APTT değerlerinden farklılık göstermemektedir. Bu durum literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla çok yakın korelasyon göstermektedir. Çalışmamızda bulduğumuz değerlere dayanarak, normal APTT değerlerine sahip olgularda bir ele PNP-APTT değerlerine bakmanın gereksiz bir masrafa ve zaman kaybına yol açtığını söylememiz mümkündür. Ancak lupus antikoagülanı pozitif olan ve tedavi edilmemiş kadınlarda tekrarlayan düşük ya da fetal ölüm riski %90'dan fazladır. Bu nedenle, uzamış APTT 'ii tekrarlayan gebelik kayıpları olan olgularda mutlaka APTT'nin yanısıra spesifik bir test olan PNP'yi yapmak ve lupus antikoagülanı pozitifliğini kesin göstermek gereklidir. Zira lupus antikoagülanı pozitif olguların tedavi sonrası normal bir bebeğe sahip olma şansı %80'lere ulaşmaktadır.

Sonuç olarak, pahalı ve zaman alıcı bir test olan PNP'nin spesifik bir test olarak bilinmesi ve sadece uzamış APTT'li olgulara uygulanması; APTT'nin ise bir tarama testi olarak tüm açıklanmamış tekrarlayan gebelik kayıplı olgularda uygulanması, yerinde bir karar olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Unander AM, Olding LB: Habitual Abortion. Parental Sharing of HLA antigens, absence of maternal blocking antibodies and suppression of maternal lymphocytes. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 1983; 4:171
2. McIntyre JA: Faulk PW et al: Immunologic testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion. Obstet. Gynecology: 1986; 67:169.
3. Triplett DA et al. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization prosedüre. Am J Clin Pathol 1983; 79:768.
4. Lachner K et al. Lupus Anticoagulants and thrombosis: a study of 25 cases and review of the literature. Hemostasis. 1985; 15:254.
5. Ming CH. Anticardiolipin antibodies and habitual abortions Am. J. Obstet. Gynecol. 1988; 198:2, 441-442.
6. Unander AM et al: Anticardiolipin antibodies and complement in 99 women with habitual abortion. Am.J.Obstet Gynecol 1987 Jan; 156 (1)114-9.

7. Branch DW, Scott JR et al: Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant. N. Eng. Journal of Med. 1985;313:1322.
8. Gastineau DA, Kazmier F JO, et al. Lupus anticoagulant: an analysis of the Clinical and Laboratory Features of 219 cases. Am. J. Hemat. 1985; 19:285.
9. Duran-Suarez JR: Incidence of Circulating anticoagulants in a normal population. Acta Haematol. 1982; 67:217-9.
10. Cowchock S, Smith JB, Gocial B. Antibodies, phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions. Am J Obstet Gynecol 1986; 155:1002-10.
11. Petri M. Goibus M. Andersen R et al: Antinuclear antibody iupus anticoagulant and ACA in women with idiopathic Arthritis. Rheum. 1987; 30:601-6.
12. Derne GJ. Enlert JH, Harris EH et ai. Fetal loss in SLE; association with ACA. J Obstet Gynecol 1985; 5:207-9.
13. Hanly JP. Sultan Y et al. Spontaneous recurrent fetal wastage and autoimmune abnormalites. A study of 14 cases. Clin. Immunol. Immunopathol. 1986; 39:523-30.
14. Lübbe WF, Liggins GC. The lupus anticoagulant. Clinical and Obstetric implications. N.Z. Med J. 1984; 97:398.
15. Schleider MA, Hackman RL et al. A Clinical study of the lupus anticoagulant. Blood 1976; 48:499-509.
16. Thiagarajan P. Shapiro S, de Marco L. Monoclonal Immunoglobulin M. Coagulation inhibitor with phospholipid specificity, J.Clin.Invest.1980; **66**, 397:405.