

49722

T.C.  
Sosyal Sigortalar Kurumu  
Göztepe Eğitim Hastanesi  
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Servisi  
Şef: Doç. Dr. Selma ÇEKİRDEK

**TEKRARLAYAN DÜŞÜK VE İNTRAUTERİN  
ÖLÜM OLGULARINDA ANTİFOSFOLİPİD  
ANTİKORLARIN VE PROTEİN S  
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

T 49722

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Dr. Hale ARAL

İstanbul - 1996

## TEŞEKKÜR

Göztepe Sosyal Sigortalar Hastanesi'nde geçen süre içinde eğitimime yardımcı olan değerli, şefimiz. Doç. Dr. Selma Çekirdek'e, şef yardımcımız Asuman Arasan'a, Başasistanımız Filiz Nartop'a değerli uzman, asistan, biyolog, laborant arkadaşlarıma; tezimi çalıştığım sürede bana olanaklar sağlayan Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı Şefi, Şef yardımcısı, Başasistanı ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Başhekimimiz Doç. Dr. Koptagel İlgün ve tezin materyalini sağlamamızda yardımcı olan Göztepe Sosyal Sigortalar Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Başhekim yardımcılarını ve Şeflerine, uzman Dr. Canan Gökçen'e ve asistan Dr. Hatice Yoğmurkaya'ya teşekkürü borç bilirim.

Dr. Hale ARAL

## KISALTMALAR VE AÇIKLAMALAR

ACA	: Antikardiopilin antikor
APA	: Antifosfolipid antikor
APC	: Aktif Protein C
APT	: Aktif parsiyel tromboplastin zamanı
ARA	: American Rheumatism Association
Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartik asit
AT III	: Antitrombin III
$\beta_2$ GPI	: $\beta_2$ Glikoprotein 1
C4b-BP	: C4b'yi bağlayan protein
DİC	: Yaygın damar içi pıhtılaşması
dRVVT	: Diluted Russel Viper Venom zamanı
ELİSA	: Enzyme-Linked immunosorbent assay (Metod bölümünde prensipleri açıklanmıştır)
F	: Fosfolipid
FPS	: Serbest protein S düzeyi
FDP	: Fibrin yıkım ürünleri
Glu,Gla	: Glutamik asid
KCT	: Kaolin pıhtılaşması zamanı
KD	: Kilo Dalton
LA	: Lupus antikoagülanı
PA	: Plazminojen aktivatörü
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitörü
PC	: Protein C
PEG	: Polietilen glikol
PI	: Plazmin
PNP	: Trombosit nötralizasyon çalışması
PS	: Protein S
PT	: Protrombin zamanı
RIA	: Radioimmunaassay
T	: Doku (tissue)
TF	: Doku faktörü (tissue factor)
TFPI	: Doku faktörü inhibitörü (tissue factor pathway inhibitor)
Th	: Trombin
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
TPS	: Total Protein S
VDRL	: Veneral Research Laboratory testi

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE ARAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
MATERYAL VE METOD.....	27
BULGULAR .....	37
TARTIŞMA .....	41
SONUÇ .....	48
ÖZET .....	50
KAYNAKLAR .....	51
EKLER	

## GİRİŞ VE AMAÇ

Antifosfolipid antikörlerin varlığı, arteriel ve venöz trombozların oluşumunda predispozisyon olarak kabul edilir. Bu antikörlerin varlığı sistemik lupus eritematosus olan kadınlarda fetal kayıp riskini gösteren en iyi bulgu olmakla beraber (1), otoimmün bozukluğun gösterilmediği olgularda bu antikörlerin bulunması "Primer Antifosfolipid Antikör Sendromu" tanısını koydurur. Bu antikörlerin bulunduğu gebe kadınlarda spontan düşük, ölü doğum, intrauterin fetal gelişme geriliği, erken doğum, arteriel ve venöz tromboz meydana gelebilmektedir. Bu antikörler gebelikler arası normal zamanlarda azalabilir veya kaybolabilir ve bir sonraki gebelikte artan aktivite göstererek, fetüs kaybına neden olabilir. Tüm gebe kadınlarda rutin olarak bu antikörlerin aranmasının bir gereği ve yararı yoktur (Tablo 1) (2).

Arka arkaya iki spontan düşük olması halinde tekrarlayan düşüklerden bahsedilir (Tablo 2) (3).

Tablo-1 : Antifosfolipid Antikörlerin gebe kadınlarda araştırılması gerektiği durumlar. (2)

Tekrarlayan düşük veya fetüs kaybı  
Bağ dokusuyla ilgili bozukluklar  
Arteriel veya venöz trombotik olay hikayesi  
koagülasyon test sonuçlarının uzamış bulunması  
Otoantikör çalışmalarının pozitif bulunması  
Sifilize ait serolojik testlerin yalancı pozitif sonuç vermesi  
Açıklanamayan trombositopeni

Etyolojinin belirlenemediği olgularda ise, immünolojik faktörler ve bazı genetik olayların sorumlu olabileceği düşünülmektedir (4). Bununla birlikte eskiden fetüs kaybıyla ilgisi olduğu düşünülen rahatsızlıkların patofizyolojisinde otoimmün bozuklukların olduğu bugün bilinmektedir.

Tablo-2 : Düşük nedenleri (3)

- 1- Normal istatistik
- 2- Genetik (sıklıkla görülen bozukluk : dengeli translokasyondur)
- 3- Çevresel (sigara, alkol, kahve, anestezi ajanları)
- 4- Endokrin (Tiroid ile ilgili bozukluklar, DM, luteal faz defekti)
- 5- Anatomik
- 6- Enfeksiyöz
- 7- İmmünolojik (Antifosfolipid Antikorlar, TLX antiijenleri)

Konuyla ilgili bugüne kadar yapılmış çalışmalar gözden geçirildiğinde, lupus eritematosus bulunmadığı halde lupus antikoagülonları bulunabilen olgularda bazı ciddi trombotik olayların ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Sistemik düzeyde oluşan bu değişikliklerin gebeliğin devamında esas rol oynayan utero-plasental ünitede meydana gelmesi durumunda gebeliğin olumsuz şekilde etkilenmesi kaçınılmazdır. (Plasental yatakta olası bir trombotik olay: fetüs kaybına neden olmaktadır) (4).

Protein C sistemi içinde yer alan Protein S 'nin antikoagülan fonksiyonu çok önemlidir. Daha önceden yapılan çalışmalarda normal gebelerde ve oral kontraseptif kullanan normal kadınlarda plazmada Protein S düzeyleri düşük bulundu.

Protein C / Protein S antikoagülan yolunun elemanları (özellikle serbest Protein S) Antifosfolipid antikorları olan hastalarda normal dışı olabilir. Bu elemanların fetal kayıp için bir predispozisyon olup olmadığının araştırılması amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Bu araştırmada tekrarlayan düşükle intrauterin ölüm meydana gelmiş olgularda Antifosfolipid Antikor pozitifliğinin prevalansını ve plazmada serbest Protein S antiijenik düzeylerini belirlemeye çalıştık.

## GENEL BİLGİLER

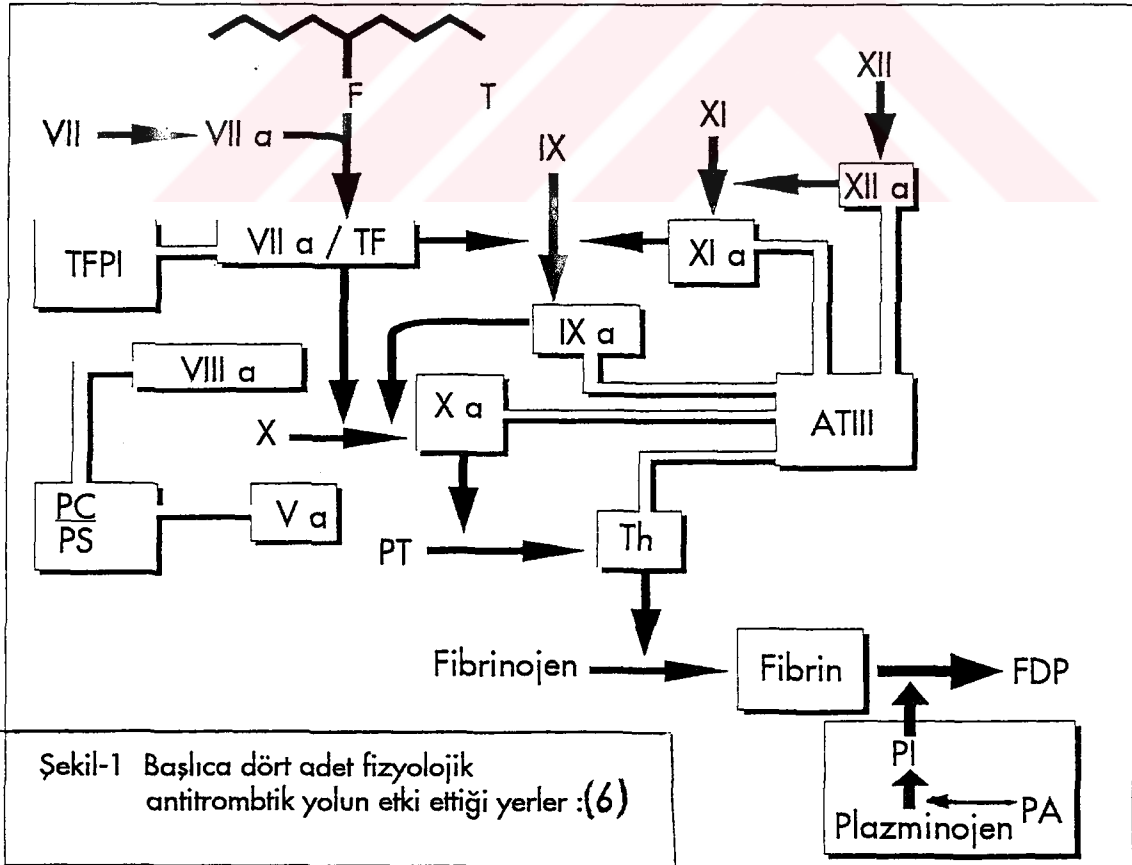
Nedenine bakılmaksızın tromboza kalıtsal eğilim hali "trombofili" olarak bilinmektedir.

Sekonder hiperkoagülebilite durumları çoğunlukla tromboza predispozisyonla ilgili kazanılmış bozukluklardır. Bu durumlar, tromboza kalıtsal predispozisyonu olan hastalarda (primer hiperkoagülebilite durumları (Tablo -3), tromboz riskiyle birleşir veya trombotik ataklarının tetiğini çeker. Sekonder hiperkoagülebilite durumlarının çoğunda tromboz gelişiminin mekanizması pek az anlaşılabilmiştir ve kompleks ve multifaktöriyel gelişimler olduğu düşünülmektedir (1). Başlıca venöz stazın artmasına bağlı olduğu düşünülen sekonder hiperkoagülebilite durumları arasında uzun süren istirahat, şişmanlık, konjestif kalp yetmezliği ve ameliyat sonrası durumlar yer alır (2). Koagülasyon sisteminin aktivasyonu ise, malign hastalıklar, gebelik, östrojen kullanımı (oral kontraseptifler dahil ), nefrotik sendrom ve lupus antikoagülanı gibi durumların altında yatan başlıca mekanizmadır (3).

Tablo-3 : Primer Hiperkoagülebilite durumları. (1)

Durum	Eksiklik
Antitrombin/heparin bozuklukları	Antitrombin eksikliği Heparin kofaktör II eksikliği
Protein C/Protein S bozuklukları	Protein C eksikliği Aktif protein C direnci Protein S eksikliği
Fibrinolitik bozukluklar	Hipoplazminojenemi Displazminojenemi Plazminojenaktivatör eksikliği Doku plazminojen aktivatörü azalması Plazminojen aktivatör inhibitörü artması Histidin'den zengin glikoprotein'in artması Disfibrinojenemi

Başlıca trombosit aktivasyonu ve vasküler bozukluklar nedeniyle oluşan sekonder hiperkoagülebilite durumları kapsamı içinde myeloproliferatif bozukluklar, heparin kaynaklı trombozis, trombotik trombositopenik purpura ve homosistinüri yer alır (en sonuncusu artan aterosklerozis içinde risk faktörü olmaktadır). Sekonder hiperkoagülebilite durumlarının çoğunda patogenez kompleks olduğu halde primer hiperkoagülebilite durumları (=pretrombotik durumlar) birbirinden farklı protrombotik mutasyonlar sonucu oluşan özel koagülasyon bozukluklarına bağlıdır. İnsan vücudunda normal kan akımını sağlayan belli fizyolojik düzeylerde antitrombotik proteinler bulunur. Bu doğal antikoagülanlar sistematik kan akımını normal şartlar altında korurlar ve vasküler zedelenmenin olduğu yerlerde kanın pıhtılaşmasını sınırlarlar. Normalde bu proteinlerin antikoagülan aktivite gösterebilmeleri, vasküler endotel bütünlüğü üzerinde optimum fonksiyonları ile sağlanır. Başlıca dört antitrombotik yol vardır : antitrombin ; Protein C / Protein S ; fibrinolitik sistem ; ve TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) (6) (Şekil 1).





Doğal antikoagülanlardan birinin eksikliği minör ateşleyici bir faktörün (sekonder hiperkoagüle durum) de varlığıyla trombogenezise ortam hazırlar. Pretrombotik durumlarda minör risk faktörlerinin birleşmesi serebral infarkt riskini arttırabilir. Wallis ve Godwin 'in yayınladıkları olgu örneğinde, 21 yaşındaki genç bir kadının geçirdiği serebral iskemi ile Protein S eksikliği, sigara kullanımı, oral kontraseptif kullanımı ve mitral valv prolapsusu arasında ilgi bulunmaktadır (7). Kalıtsal nedenlerle trombotik olaylara eğilimli hastaların % 50'inde beraberinde bir risk durumunun da ilgili olduğu iyi bilinmektedir. Diğer yandan bu hastaların risk altında olduğu durumlarda trombozis gelişme prevalansı üzerinde pek az çalışma yapılmıştır. Stefano ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 168 majör venöz trombotik atakta % 49 oranında tetiği çeken bir başka nedenin olduğu anlaşıldı. En sık neden gebelik ve puerperal dönem olduğu (30 olgu, % 17 oranında) ve ameliyat (21 olgu, % 12 oranında) belirtilmiştir. Protein C ve Protein S eksikliğine bağlı görülen trombozlar, gebelik ve doğum sırasında değil de, daha çok post partum dönemde olmaktadır. Antitrombin-III eksikliğinde ise, gebelik ve doğum sırasında da yüksek oranda trombotik olay gelişti. Normal bir gebeye nazaran, bu kişilerde trombotik olay prevalansı 20 katı daha yüksektir. Ameliyat türü ve eksikliğin tipi ne olursa olsun ameliyat ciddi trombotik risktir. Oral kontraseptif kullanımında da yüksek oranda tromboz riski vardır (eksikliğin tipi ne olursa olsun). Kalıtsal nedenlerle trombotik olaya eğilimli kişilerde oral kontraseptif alımının tetikleyici olduğu trombotik olay prevalansı % 7 'dir. Stefano ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu ise, yüksek oranda (% 71) tromboz görüldü, kalıtsal nedenlerle trombotik olaya eğilimli kadınların oral kontraseptif kullanmamaları gereği ortaya çıktı(8).

Warfarin tedavisine başlamadan önce veya bırakıldıktan en az 2-3 ay sonra alınacak kan örneğinde doğal antikoagülanın eksikliği araştırılabilir. Eğer warfarin tedavisinin test amacıyla durdurulması klinik olarak olası değilse, Protein C ve Protein S konsantrasyonları diğer bir vitamin K bağımlı proteinle (örneğin protrombin) karşılaştırılabilir. Protein C veya Protein S konsantrasyonlarında protrombine göre, orantısız bir azalma herediter bir eksiklik durumunu gösterir. Bu şekilde karşılaştırmalı bir test sabit oral antikoagülan

alındığı bir dönemde yapılmalıdır (6). Ancak, bu doğal antikoagülanların heterozigot eksiklikleri, genç olup, tromboembolik hastalık hikayesi bulunan hastaların sadece % 9-21 'inde görülmektedir. Yakın zamanda Dahlbäck ve arkadaşları yeni bir trombofilik defekt buldular. Buna göre, aktif hale gelen Protein C'ye karşı antikoagülan cevabın bozukluğu, ailevi trombotik olayların gelişiminde etyolojik bir faktör olarak gösterildi (9). 1993 'de Koster ve arkadaşlarının Hollanda 'da yaptıkları bir çalışma sonucuna göre, APC direnci venöz trombozun herediter nedenleri arasında en sık rastlananıdır (10). Griffin ve arkadaşlarının iddiasına göre, tromboembolik hastalık öyküsü olan hastaların %50-60'ında ailevi APC kofaktör (olduğu varsayılan) eksikliği bulunmaktadır (11).



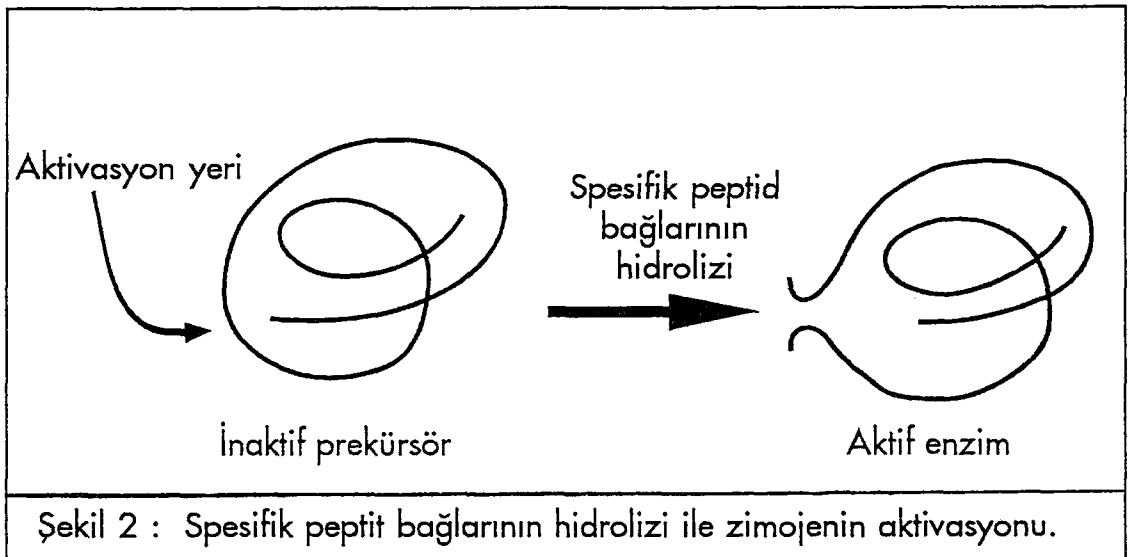
### PROTEİN C SİSTEMİ :

Protein C, molekül ağırlığı 62.000 dalton olan glikoprotein yapısında, vitamin K bağımlı serin proteaz prekürsörü 'dür (12). *(Primer yapılarındaki tekrarlayan aminoasit dizimleri ortak olan enzimlerin evrimsel kökeni ortak gibi görünmektedir, örneğin, proteaz olan tripsin, kimotripsin gibi... Dizim benzerlikleri izoenzimler arasında daha sık rastlanır. Enzimin aktif merkezinin hemen yanındaki aminoasit dizimi sıklıkla ilgili fonksiyon gören enzimlerde yakın benzerlik gösterir.*

Örneğin, serin proteazların bu ismi almalarının nedeni, aktif merkezde bu aminoaside sahip olmalarıdır (13).

Protein C  $\gamma$  - karboxi-glutamik asid rezidüleri içerir. Vitamin K protrombin, faktör VII, IX, X, Protein C, Protein S 'nin N ucu glutamik rezidülerinin,  $\gamma$  karboksi glutamik asidlere karaciğerde çevrilmesi sırasında kofaktör olarak iş görür. Bu aminoasitler (glu rezidüleri) vitamin K bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin fonksiyonel ve antijenik seviyelerinin etkileşim alanını sağlar (12). Bunu sağlarken, (kalsiyum iyonları varlığında) fosfolipid yüzeyler üzerine bağlanma yeteneği kazandırır. Bu bağlanma, hemostazın aktivasyonu için gereklidir. Burada spesifik proteolitik bağlanma koagülasyon zimojenini aktif serin proteaza çevirir (14).

Protein C, hafif ve ağır zincirlerinin disülfid bağı ile bağlanmasından oluşur. Ağır zincirin aminoterminal ucundan küçük peptidin alınmasıyla Protein C aktive olur. Protein C 'yi aktive eden birçok enzim vardır (15). Ağır zincirin trombine bağlanması sonucu, aktif Protein C oluşur (12). (Bazı enzimler inaktif prekürsör olarak sentezlenir, fizyolojik olarak uygun zaman ve yer bulunca da aktive olur. Sindirim enzimleri bu tip kontrol gösterirler. Proteolitik aktivasyon gerektirirler. İnaktif proteolitik enzimlere zimojen denir. Bu tip kontrol kanın pıhtılaşmasında rol alan enzimatik reaksiyonlarda da tekrar tekrar kullanılır) (Şekil-2) (16).



Bu bağlanmaya trombomodulin yardım eder. Trombomodulin endotel hücre yüzeyinde reseptör protein olup, (trombini) bağlayarak, substrat özgürlüğünü değiştirir (12) ; trombinin fibrinojen bağlama, faktör V aktivasyonu, trombosit aktivasyonu fonksiyonlarını yitirmesine neden olur (15). Böylece trombinin koagülan aktivitesi göstermesi önlenir. Ayrıca, dolaşımda potent bir antikoagülan olan aktif Protein C 'nin bulunmasını sağlar (12).

Aktif Protein C pıhtılaşmada hız sınırlayıcı basamaklarda faktör Va ve VIII a'yı enzimatik olarak inaktive eder. Bunun için fosfolipid, kalsiyum iyonları ve Protein S gereklidir (15).

Faktör V a ve X a trombositlerin fosfolipid yüzeyinde protrombinaz, kompleksi oluşturarak, protrombin aktivasyonunu artırırlar, bu kompleks hemostazda trombin yapımında en önemli noktadır. Aktif Protein C bu kompleksin aktivitesini inhibe eder (12).

Aktif Protein C direncinin faktör V 'e ait kalıtsal bir moleküler defekte bağlı olarak geliştiği ve bunun sonucu Faktör V 'in inaktivasyonunun APC tarafından gerçekleştirmediği bulundu.

1994 'de Bertina ve arkadaşları aktif Protein C direncinin Faktör V 'in ağır zincirine ait 1961 'inci nükleotidinde guanin 'in adenin 'e yer değiştirmesi sonucu oluşan mutasyonu şeklindeki moleküler defekte bağlı olarak aktif Protein C 'nin keseceği (proteolitik aktivesini göstereceği) noktanın ortadan kalktığını gösterdiler (10). Bugün birçok çalışma grubu aktif Protein C direncini test ederek, trombotik hastalık hikayesi olan hastaları taramaya çalışmaktadır. 1994 'de Walker ve arkadaşları tromboembolik hikayesi ve APC direnci olan hastalarda yaptıkları bir çalışmada antifosfolipid antikor prevalansını yüksek buldular. (İnsan hücre kültürü çalışmalarının sonucuna göre, antifosfolipid antikorların Faktör V a 'nın yıkımını inhibe ederek, APC 'nin antikoagülan etkisini bozabileceği düşünülmektedir) (9).

Aktif Protein C 'nin antikoagülan etkisi dışında profibrinolitik aktivitesi de vardır. Doku plazminojen aktivatörünün başlıca inhibitörü olan plazminojen aktivatör inhibitörünü (PA-I) Ca++ ve fosfolipid varlığında nötröle ederek, gerçekleştirir. Böylece, tPA serbest kalır (15) (Şekil-3) (12).

İnsanlarda bulunan Protein C konsantrasyonu 4 µgr/ml 'dir. Aktivitesi ve antiijenitesi 70-140 ü/dl 'dir. Değişik yaş grupları ya da cins nedeniyle bağlantılı bir fark gözlenmez (15).

Protein C'nin eksikliğinin kalıtsal geçişi otozomaldır. Homozigotlarda yeni doğan döneminde ölümle sonuçlanan trombozlar ve deri lezyonları ve DİC (*büyük hasarlı*) görülebilir. Prenatal tanı homozigotların bulunmasında önemlidir (14). 5-6 ü/dl gibi çok az miktarda da olsa, Protein C aktivitesi neonatal ölümleri önlemek için yeterlidir. Ancak, yetişkin yaşamda tekrarlayan trombotik atakları önleyemez (11).

Heterozigotlarda kısmi Protein C eksikliği 50 ü/dl altına düşme halinde genç ve yetişkinlerde trombotik olaylar görülür. Örneğin, derin ven trombozu, pulmoner emboli, yüzeysel flebit, gibi...

**Kazanılmış Protein C eksikliği nedenleri : (14, 17, 18)**

1- DİC : Yaygın damariçi pıhtılaşma durumlarında fonksiyonel aktivitesi, antiijenik düzeylerinden daha hızlı düşüş göstermiştir. Burada aktif Protein C'nin spesifik bir inhibitörle birebir kompleks yapabileceği düşünüldü.

Dissemine intravasküler koagülopati geliştiğinde Protein C düzeyleri normal ya da azalmış olabilir. DİC'in en şiddetli döneminde en düşük düzeyde Protein C izlenirken, klinikte görülen düzelmeye paralel olarak normale döner. DİC'i kontrol etmede Protein C önemli bir rol oynar. Aşırı kaybıyla tromboz oluşumu kontrolden çıkar.

Ameliyat sonrası dönemde Protein C ve antitrombin III düzeylerinde azalma görülmesi bu hastalarda trombozis görülme sıklığını arttırabilir. Ameliyat sonrası hiperkoagülebilite durumunda Protein C'nin rolü, Protein C sistemi ve antitrombin III'ün araştırılmasıyla anlaşılabilir (15).

2- Karaciğer hastalıkları : Hepatit, siroz gibi hastalıklarda Protein C'nin yapımı ve karboksilasyonu azalacaktır.

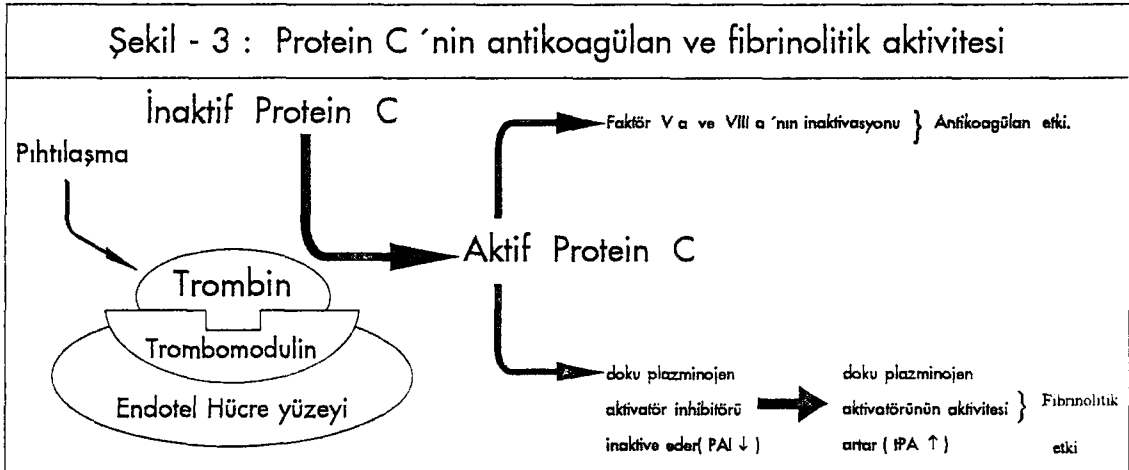
3- Vitamin K eksikliği : Bu durumda biyolojik aktivitesi olmayan ancak immünolojik metotla ölçülebilen bileşiklerin sentezi devam eder. Oral antikoagülan alan insanlarda subkarboksile Protein C vardır (17). Pıhtılaşma metoduna dayalı veya kromojenik substratla Protein C aktivitesi ölçülebilir. (Kromojenik substratla amidolitik aktiviteye bakılır). Warfarin kullanımında önce aktiviteleri azalır. (Antiijenik olarak % 40-115 iken, aktivitesi % 26-92 bulunan çalışmalar vardır)



Antijeniteye göre aktivitede daha fazla olan bu azalma antikoagülan alan tüm hastalarda görülmüştür. Hipokarboksile Protein C tipleri snake venom aktivator ile aktive edilip, kromojenik substrat ile enzimatik olarak ölçülebilir, ancak, fosfolipidler ve faktör V a, VIII a ile ilişki kurması mümkün değildir. Oral antikoagülan alanlarda veya diğer vitamin K eksikliklerinde fizyolojik Protein C aktivitesinin ölçülmesinde antikoagülan çalışma önerilmektedir (19).

Warfarin tedavisi sonucu olarak Protein C ve Protein S düzeyleri düşüş gösterir, ancak daha önce faktör VII 'nin düşüşü gözlenir. Pıhtılaşma faktörlerinde antijenik düşme, aktivitelerinin düşmesini takip eder. Tek doz olarak yüksek düzeyde warfarin alımı sonrası görülen düşüş ; günlük daha düşük düzeyde warfarin alımına göre fazladır. Yüksek doz alındığında protrombin zamanı (PT ) 46. saatte peak yapacak şekilde arttı ve düştü. Düşük doz warfarin alanda istikrarlı idi. Faktör VII aktivitesi yüksek doz alanda 4-6 saatte en düşüktü. Vitamin K bağımlı prokoagülanlar ( F II, VII, IX, X ) ve antikoagülanlar (Protein C, S) her birinin sentez ve yıkım hızının farklı olmasına dayanarak, farklı oranlarda düşüş gösterirler. Yeterli büyüklükte yükleme yapılarak sentez tamamen durdurulabilir ve yarılanma süreleri ara ara yapılan ölçümlerle ortaya çıkarılabilir.

Warfarin tedavisine başlanmasıyla protrombin, faktör X ve IX 'dan önce Protein C 'nin düzeyi düşeceğinden, hiperkoagülebilite durumu gelişebilir. Bu yan etkinin neden deride lokalize olarak kapiller tromboz, doku nekrozu oluşturduğu bilinmemektedir. Warfarin tedavisine başlandıktan sonra birkaç gün içinde eritem belirir, hemorajik bül ve deri nekrozuna gider.



Önerilen şudur ki ; Warfarin'in yüksek doz yüklenmesi yerine heparinin ilk planda antitrombotik etkisinden yararlanılabilir. Böylece Protein C ve S'nin erken düşüş etkisinden kurtulunur (20).

4- Lösemide görülen Protein C eksikliğinin nedeni karaciğerin fonksiyon görememesidir. Bu diğer malign hastalıklar için de geçerlidir.

5- Nefrotik sendromda, protein kaybına bağlı Protein C ve Protein S eksikliği söz konusudur.

6- Fetüste immatür karaciğer oluşumu nedeni ile vitamin K bağımlı faktörlerin düzeyi düşüktür. Yeni doğanda Protein C 30-64 ü/dl'dir. 6 aylıkken normal değerlere ulaşır.

7- Bunlardan başka spontan mutasyon sonucu gelişen kazanılmış Protein C eksikliği de söz konusudur. İzole tromboembolik komplikasyonlarda (*derin ven trombozu, pulmoner emboli, arteriel tromboz, inme, myokard infarktüsü*) Protein C düzeyi normal bulunur. Bunun nedeni trombozun lokalize oluşudur. Lokal olarak Protein C'nin azalmış düzeyleri trombüs etrafında olabileceği halde sistemik olarak belirgin Protein C eksikliği görülmez.

Trombotik hastalığın görüldüğü bir ailede azalan Protein C antikoagülan aktivitesi, normal veya artmış amidolitik aktivite ve Protein C antiijenitesi ile çatışırsa, tip II ( kalitatif) Protein C eksikliğinden bahsedilebilir. (*Bu kişinin oral antikoagülan almadığı kesin biliniyorsa bu sonuca varılabilir*). Antiijenitesi %143 ve antikoagülan aktivitesi %60 olup arada büyük bir fark gözlenen bir olguda aktivitedeki azlığın nedenleri şunlar olabilir ;

1 Gla-domainlerden yoksun kalan Protein C, yetersiz karboksile oluşuyla antikoagülan aktivite gösteremez.

Propeptidin  $\gamma$  karboksilasyonla interferans göstermesi, Gla-rezidülerden yoksun disfonksiyonel Protein C salınımına yol açar.

2 Konformasyonel anormallik aktif Protein C'nin faktör V a ve VIII a ile etkileşiminin bozulmasına yol açar.

3 Protein S ile etkileştiği yerde anormallik oluşu nedeniyle, amidolitik çalışmalarda aktif Protein C'nin Protein S, fosfolipidler ve Va ve VIII a ile etkileşimlerini ölçemeyiz. Bu yöntemle küçük sentetik substratların hidrolizi ölçülür. Aktif bölgeye yakın yerdeki defekt sonucu amidolitik aktivite düşük çıkabilir.

## PROTEİN S

Protein S vitamin K bağımlı bir plazma proteindir, esteraz fonksiyonu yoktur (22,23). Molekül ağırlığı 84,000 olup, tek zincirli glikoproteindir. (yapısında %7 karbonhidrat bulunur). Plazma konsantrasyonu 25 mg/l 'dir (24). Protein S insan Hep G 2 hepatoma hücreleri, endotel hücreleri ve megakaryositler tarafından sentezlenir ve salınır (11). Bu inaktif prekürsör 'ün, aktif forma dönüşmesi için glutamik rezidülerin vitamin K bağımlı karboksilaz ile karboksilasyonu gerekir ki, böylece molekülün kalsiyumla etkileşimine uygunluğu sağlanır (23).

Protein S 'nin primer yapısı DNA klonlama ve amino asit dizilimi analiziyle tam olarak anlaşıldı. Bu çalışmalar sonucunda Protein S 'nin multi-domain yapıda olduğu ve kısmen diğer Vitamin K bağımlı koagülasyon faktörlerine benzediği ortaya çıktı. Amino terminal  $\gamma$  karboksi-glutamik asit (Gla) domain bölgesi "trombine duyarlı bölge" olarak adlandırıldı, takip eden dört domain epidermal büyüme faktörü (EGF) prekürsörüne homolog iken bir karboksi terminal polipeptid domain insan seks hormonu globulin'e (SBHG) homolog idi. Gla uçlarına ilaveten Protein S aynı zamanda bir adet  $\beta$ -hidroksile Asp ve 3 adet  $\beta$ -hidroksile Asn ucu EGF domainlerinde yer alır.

Diğer vitamin K bağımlı koagülasyon faktörlerinde olduğu gibi hem Gla uçları, hemde hidroksile amino asit uçları, Protein S 'nin kalsiyum bağlamasında görev alır, uygun olan şeklini devam ettirmesini sağlar ve Protein S 'ye fosfolipid 'e bağlanma özelliği verir. Diğer domainlerin (EGF ve SBHG) görevi henüz anlaşılamamıştır.

Trombine duyarlı bölgenin şekli Protein S 'nin kofaktör fonksiyonu göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca trombin tarafından proteoliz sonucu Protein S kofaktör aktivitesi kaybolur (25).

Protein S 'nin esansiyel bir antikoagülan fonksiyonu vardır. Aktif Protein C 'nin kofaktörüdür ve stokiometrik bir kompleks yaparak fonksiyon görür (Şekil 3) (23). Kalsiyum varlığında bu kompleks fosfolipid yüzeylere bağlanır ve koagülasyonun regülasyonunda rol alır (26). Belkide Protein S Protein C 'nin fosfolipid membranlara olan afinitesini arttırarak Protein C 'nin antikoagülan fonksiyonunu arttırır (27). Trombin proteoliz ile Protein S 'nin antikoagülan etkisini kaybettirebilir ; ancak fosfolipide olan afinitesi aynı kalır (28).



Protein S 'nin C4b binding-proteine (C4b - BP) bağlı olarak dolaşımda bulunan kısmı % 60 'ıdır. % 40 'ı serbest Protein S olup, Protein C 'nin kofaktörü olarak çalışır. Protein S 'nin C4b-BP ile yaptığı nonkovalan kompleksin miktarı bazı hastalıklarda değişir, bu kompleksin fonksiyonu henüz bilinmemektedir (29).

C4 b-BP kompleman sisteminde inhibitör proteindir. Kompleman sisteminin dolaşımda aktivitesinin regülasyonu görevine sahip birçok plazma proteini bir süredir bilinmektedir, amplifikasyondaki önemli rolleri nedeniyle C3 konvertazlar regülasyonda primer bir odak oluşturur. Faktör H, C3 b 'nin faktör I ile parçalanması ; benzer şekilde C4 b-binding protein (C4 b-BP), faktör I yoluyla C4 b 'nin parçalanmasında kofaktör olarak davranır. Ancak, faktör H ve C4 b-BP dolaşımda ken kompleman aktivasyonunu etkili bir şekilde kontrol edebildiği halde, bu proteinlerin genel olarak doku ve hücre yüzeyi üzerinde (kompleman amplifikasyonunun) etkisiz düzenleyicileri olduğu düşünölmektedir (30).

Nukatsuka ve arkadaşları yayınlarında C4 b-BP 'ye bağlı halde bulunan Protein S 'nin lökosit proteazlarına karşı dirençli olduğunu, buna göre iltihabın olduğu yerde C4 b-BP 'nin Protein S 'ye bağlanarak, onu proteolitik yıkımdan korumada rol alabileceğini ileri sürmektedir (31).

C4 b-BP plazmada iki farklı halde bulunur : birisi düşük moleküler ağırlıklı tip olup (total ağırlığın % 20 'sini oluşturur), Protein S 'ye hiç afinitesi bulunmaz, diğeri yüksek moleküler ağırlıklı tip (total ağırlığın % 80 'inini oluşturur) Protein S ile birebir kompleks oluşturur (*denge sağlanana kadar*) (27, 32).

**Protein C eksikliğine de neden olan karaciğer hastalıkları ve karaciğerin normal fonksiyon görmemesi, vitamin K eksikliği, nefrotik sendrom dışında plazmada Protein S düzeylerini etkileyen nedenler şunlardır :**

1- C4 b-BP akut faz reaktanı oluşuyla birlikte iltihabı cevapta konsantrasyonu % 400 kadar artabilir. Bu durumda, serbest Protein S oranı düşer (çünkü serbest olan Protein S 'yi daha çok kendine bağlar). Bu nedenle, bu testlerin, hastalıkların (inme gibi...) akut döneminde yapılmaması önerilir. Enfeksiyon olduğu durumlarda C4 b-BP oran artar, Protein S de bağlı (*inaktif*) forma kayar (7).

2- Fetüste Protein S önemli ölçüde serbest olarak dolaşır, total Protein S 'nin % 82-86 'sı serbest Protein S 'dir. Yeni doğanlarda total Protein S 'nin % 64 'ü serbesttir. Yetişkinde ise, bu oran % 41 olur. Fetüste C4 b-BP bulunamazken, yeni doğanda da düşük düzeylere rastlanır. Bu nedenle serbest Protein S fetüste ve yeni doğanda baskındır (33).

3- Sigara içenlerde Protein S 'nin düşüklüğü gösterilmiştir (7).

4- Total ve serbest Protein S erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir ve yaşla birlikte artış görülür (33).

5- Gebelikte total ve serbest Protein S konsantrasyonlarının düştüğü bilinmektedir (10). Gebelik ve özellikle oral kontraseptif kullanımı kazanılmış Protein S eksikliği ile ilgili olduğu gibi var olan kalıtsal eksikliği daha da şiddetlendirebilir (34).

Tromboembolizm maternal ölüme yol açan nedenlerden biridir. Gebe kadınlarda venöz tromboz oluşumunu hazırlayan birçok faktör arasında prokoagülanların artmış düzeyi, pelvik ve bacak venlerinde uterus'un büyümesine bağlı venöz staz ve doğum sırasında pelvik ven hasarı yer alır. Gebelikte venöz tromboembolizm görülme sıklığının Protein C veya Protein S eksikliği ile ilgisi bilinmemektedir. Ancak, % 7 ile % 17 olabileceği ileri sürülmektedir. Gebelikte Protein C veya Protein S eksikliğinin tanısını, bu faktörlerin gebelik sırasında konsantrasyonlarındaki fizyolojik değişiklikler yanıtlanabilir. Normal gebelik sırasında Protein C ve Protein S düzeylerindeki değişikliklerdeki yazılara bakılırsa, sonuçlar çok net değildir. Faught ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gebeliğin her bir trimestirinde plazmada Protein C ve Protein S konsantrasyonlarına ait normal değişikliklerin belirlenmesi amaçlandı. Antijenik veya fonksiyonel Protein C düzeyleri açısından istatistiksel olarak belirgin bir değişiklik bulunamadı. Total Protein S de gebelikte belirgin olarak değişmedi. Serbest Protein S düzeyleri birinci ile ikinci trimestir arasında belirgin olarak düştü (0.45 ü/ml 'den 0.26 ü/ml 'ye,  $p < 0.001$ ). Üçüncü trimestir sırasında belirgin olarak daha fazla düşüş görülmedi. (18) Gebelik sırasında serbest Protein S düzeylerindeki düşüşün arkasındaki fizyolojik mekanizma bilinmemektedir. Konsantrasyondaki düşüşün nedeninin dilüsyonel olmayacağı düşünülmektedir. C4 b-BP de bir artış görülmüşse de bu Protein S düzeylerini etkilemedi. Normal gebelikte Protein S düzeyinin

arttığına dair herhangi bir yazı yoktur.

Gebelik sırasında serbest Protein S düzeylerindeki normalde olan düşüş, Protein S eksikliği tanısı koymayı zorlaştırmaktadır. Doğumdan sonra, en az 6 hafta sonra bu bozukluğun doğru tanısı koyulabilir(18).

6- Orak hücreli anemi bulunan birçok insanda serbest Protein S düzeyleri klinikte tromboz gelişme riski taşıyan kişilerin düzeylerine benzer şekilde düşüktür. Bu düşüklük C4 b-BP 'nin artan düzeylerine bağlı değildir. Bununla birlikte karaciğer fonksiyonunun bozulması veya vitamin K eksikliğine bağlı olduğuna dair de pek az kanıt vardır. Orak hücreli anemide vitamin K bağımlı prokoagülanların düzeyi genellikle normaldir. Lane ve arkadaşlarının elde ettikleri bilgiye göre, Protein S 'nin eritrosit membran veziküllerine ve dönüşümsüz (irreversible) orak hücrelere bağlanmasıyla, orak hücre bulunan plazmada serbest Protein S düzeylerinin düşük bulunuşu kısmen açıklanabilir.

Bazı araştırmacılar orak hücreli anemide serbest Protein S düzeylerinin damar tıkanıklığı olaylarının patogenezinde rol oynadığına dair iddiaları varsa da, bu henüz kanıtlanamamıştır (35).

7- Çeşitli insan genlerindeki mutasyonların venöz tromboza predispoze olduğu bugün bilinmektedir. Bu mutasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar hemostatik düzenleyici proteinlerin yapı ve fonksiyonunu anlamamıza yardımcı olmaktadır. Ancak tromboembolizm olma olasılığı açısından bakıldığında, heterozigot eksikliği gösteren geni tanımlanmış hastaların sadece bir kısmında trombotik ataklar gözlenmektedir. Diğer lokusların ve çeşitli tipte çevresel zedelenmenin etkisi sonucu oluşan alel heterojenliği, epistatik etkiler, hali hazırda gen defekti olan bireylerde trombotik olay gelişip, gelişmeyeceği konusunda rol oynayan faktörlerdir. Yine de tromboz artışına yol açan gen mutasyonlarının tümüyle tanımlanması, özel gen bozukluklarının tromboembolizm olasılığıyla ve trombotik atakların ciddiyeti ve sıklığıyla arasında ilişki kurulmasına izin verebilir (11).

Klinikteki görünümlerin ortaya çıkması, tekrarı ve şiddetiyle bu eksikliğin derecesi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (34).

AT III , Protein C ve Protein S 'nin herediter eksiklikleri proteinin düşük konsantrasyonu (%50) veya laboratuvar çalışmalarlarıyla düşük aktivitelerinin gösterilmesiyle anlaşılabilir. Buna göre protein konsantrasyonunun belirlenmesi normal fonksiyon görmeyen moleküller

üreten mutasyonları gösteremez. Bazı yazarlara göre serbest Protein S antijenik düzeyi ile Protein S düzeyi arasında yüksek bir korelasyon vardır.

1993 'te Fankoni ve arkadaşlarının bulduklarına göre fonksiyonel Protein S bozukluğu aktif Protein C direncini yansıtabilir. Cooper ve arkadaşları da göstermiştir ki, fonksiyonel Protein S çalışmaları aktif Protein C direncinden etkilenmektedir. Bulunan fonksiyonel Protein-S konsantrasyonu plazma dilüsyonundan etkilenmektedir. Daha yüksek dilüsyonlarda yüksek seviye, daha düşük dilüsyonlarda daha düşük seviyeler bulunmaktadır (35). (Bunlar koagülometrik çalışmadır).

Cooper ve arkadaşlarının çalışmaları da Fankoni ve arkadaşlarının çalışmalarını destekler niteliktedir. Buna göre aktif Protein C direnci yanlılıkla fonksiyonel Protein S eksikliği olarak tanımlanabilmektedir. Bunu önlemek için Protein S çalışması bir kaç dilüsyonda yapılır. Protein S, kit üreticilerinin önerdiği konsantrasyonların altında da çalışılır. Yüksek dilüsyonlarda Protein S aktivitesi normal bulunmaktadır. Daha önceden yanlılıkla fonksiyonel Protein S eksikliği tanısı olan kişiler APC direnci yönünden araştırmaya alınması önerildi (10).

Heterozigot Protein S eksikliği venöz tromboz için önemli bir risk faktörüdür ; trombotik hastalık öyküsü olan hastaların % 5 'inde heterozigot Protein S eksikliği görülmektedir.

*International Society of Thrombosis and Haemostasis* kuruluşunun *Bilimsel ve Standardizasyon Komitesi* 'nin önerdiği şekliyle Protein S eksikliğinin üç tipi tanımlanabilir :

**Tip I PS eksikliği :** total ve serbest Protein S antijenik düzeyleri ile birlikte aktivitesi de düşüktür.

**Tip II PS eksikliği :** Protein S aktivitesi azalmış, total ve serbest antijenik düzeyleri normal.

**Tip III PS eksikliği :** normal total Protein S düzeyi, azalmış serbest antijen ve aktivite düzeyleri (10).

Protein S eksikliği nedeniyle sıklıkla karşılaşılan klinik tablolar derin ven trombozu, bacak ülserleridir.

Tip III Protein S eksikliğinde total Protein S antiijenik düzeyi normalken, serbest Protein S antiijenik düzeyi ve Protein S aktivitesi düşüklüğüne bakarak daha fazla Protein S 'nin C4b-BP 'ye bağlandığı düşünülür. Bunun nedeni anormal Protein S molekülünün C4b-BP 'ye daha yüksek afinite göstermesi (anormal bir Protein S geninin fenotipik görüntüsü) veya dolaşan serbest Protein S'nin regülasyonunda yer alan anormal bir eleman olabilir. İki protein yer alabilir : "C4b- BP " ve Dahlböck ve arkadaşlarının tanımladığı "üçüncü eleman". Protein S 'ye yüksek afinitesi olan anormal C4b -BP  $\beta$  zincirini veya C4b-BP  $\beta$  zincirinin sentezinin artmış olması, PS - C4b- BP komplekslerinin oluşumunu arttıracığından, serbest Protein S düzeyleri düşer. Dahlböck ve arkadaşlarının çalışmalarına göre "üçüncü eleman" PS- C4b-BP etkileşimini regüle edebilir ve total Protein S düzeyleri normal olmasına rağmen serbest Protein S eksikliği görülmesi bu üçüncü elemanın genetik bir anormalliğine bağlı olabilir. Ayrıca Protein S ve C4b -BP genlerinin karşılıklı etkileşimlerinde olası bir konjenital defekt de hesaba katılabilir. Protein S, C4b -BP ( $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri) kodlayan genler üzerinde yapılacak bir çalışma bu özel tipte Protein S eksikliğinin nedenini çözecektir (34).

### LUPUS ANTİKOAGÜLANLARI :

İn vitro fosfolipid bağımlı koagülasyon reaksiyonlarını (yani protrombinin trombine çevrilmesini ) inhibe eden antikorlar lupus antikoagülanlarıdır. Bu inhibitör aktivitenin, bu antikorların antiijenik özellikleriyle direkt ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu antikorların antikoagülan aktivitelerini göstermek için "dilüe Russel Viper Venom Time" (dRVVT) çalışmasında olduğu gibi, fosfolipid konsantrasyonu düşürülür ve fosfolipid konsantrasyonu arttırılarak, inhibe edilir ; veya trombosit nötralizasyon çalışmasında (PNP) olduğu gibi fazla miktarda fosfolipid ile önceden inkübe edilir. Hasta plazması normal plazmayla karıştırıldığında, (mixing çalışması) koagülasyon reaksiyonunun süresinin uzaması düzelmez, diğer faktör eksikliklerinde ise, bu düzelir, böylece faktör eksikliğinden uzaklaşmış oluruz.

Lupus antikoagülan çalışmalarının anyonik fosfolipidlere karşı olan antikorları saptadığı düşünülmekteydi. Ancak, bu testlerde plazma **tümüyle** kullanılmaktadır. Yakın zamanda saflaştırılmış kısımların



kullanıldığı protrombinaz çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre , belli bazı lupus antikoagülanları "fosfolipide bağlı protrombin" veya " $\beta_2$  GPI" için spesifiktir. Lupus antikoagülanları heterojen olup, en az iki farklı fosfolipide bağlı plazma proteinlerine karşı otoantikörler içerir (36).

Lupus antikoagülan çalışılacak plazma trombositten ne kadar arındırılırsa, testin duyarlılığı o kadar arttırılmış olur. Çünkü, trombositlerin membranında bulunan fosfolipidler interferansa neden olur.

APTT koagülasyonunun intrinsek sistemini analiz etmek amacıyla uygulanır. APTT reaktifleri içinde bir aktivatör ve bir de fosfolipid kaynağı bulunur. Fosfolipidin konsantrasyonu, elde edildiği kaynak ve konfigürasyonu lupus antikoagülanlarının varlığını gösterecek duyarlılıkta reaktifin belirlenmesinde önemlidir. APTT reaktifindeki fosfolipidlerin konsantrasyonu lupus antikoagülanları ile çok büyük ilişki gösterir. Kaolin pıhtılaşma zamanı da bir çeşit APTT 'dir.

Gebelerde düşük yapma riskini göstermek için daha duyarlı olan KCT tercih edilir. Hiçbir test tek başına lupus antikoagülanını belirlemede yeterli değildir (37).

APTT sonuçlarını etkileyen analitik nedenler içinde reaktifin plazmayla inkübasyon süresinin uzunluğu önemli bir değişkendir. Belli ticari bir APTT reaktifi için inkübasyon süresi, üretici firma tarafından belirlenmiş olup ; testin kullanım amacı her ne olursa olsun, genellikle sabittir. Annie Robert ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada inkübasyon süresinin bir dakikadan on dakikaya çıkarılmasıyla APTT sonuçlarının kısaldığı bazı durumlar gözlemlendi, bunlardan biri de lupus antikoagülanı pozitif olan plazmalardı. Bunun nedeni, lupus antikoagülanının APTT fosfolipidleriyle zamana dayalı kısmi nötralizasyonu olabilir. (Fosfolipidlerin konsantrasyonu arttırıldığında, 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 gerekirken, 11 sn. 'in üzerinde bulunan test değerleri LA pozitif hastaları gösteriyordu.

(Klinikle uyumlu sonuçlar elde edildi.) "1-10 APTT" testinin standart APTT testine göre, daha fazla duyarlı olduğu gösterilmiştir (38).

SSC (*Scientific and Standardization Comitee*) alt komitesinin lupus antikoagülanlarının standardizasyonu ile ilgili toplantıları sonucunda aldığı bazı kararlar vardır. Buna göre, çoğu laboratuvarın kullandığı APTT testi, lupus antikoagülanının araştırılmasında spesifik ve duyarlı değildir. LA taraması amacıyla KCT, dRVVT, TTI (doku tromboplastin inhibisyon testi) veya modifiye edilmiş (lupus antikoagülanına duyarlılığı artırılmış) APTT önerilebilir. Yüksek hızlı santrifüjler (5,000 g, 10 dakika) veya filtreler kullanılarak, plazmaların trombositlerden iyice arındırılmaları sağlanmalıdır. Bu alt komite lupus antikoagülanının tanısı için bazı kriterler belirlemiştir (39).

### ANTİKARDİYOLİPİN ANTİKORLAR :

Antikardiyolipin antikorlar solid faz immünolojik çalışmalarda özellikle de enzim-linked immünosorbent çalışmalarda (ELISA) gösterilen antikordur. Burada "mikrotiter plate" üzerinde sabitleştirildiği varsayılan antijen kardiyolipin'dir. Bu çalışmada kardiyolipine karşı antikorların saptanması dışında, plate üzerindeki kardiyolipine bağlanan serum veya plazma proteinlerine, özellikle de  $\beta_2$  GPI'ya karşı olan antikorlar da saptanır. Bu proteinler serum veya plazma örneklerinde ve/veya sığır serumunda olabilir. Bu serumlar bloke edici tampon olarak ya da örneğin sulandırılmasında kullanılır. Çalışmanın koşulları nedeniyle anyonik fosfolipidlere kalsiyuma bağımlı olmaksızın bağlananlar uygun proteinlerdir. Lupus antikoagülanlarında olduğu gibi, antikardiyolipin çalışmasında saptanabilen antikorlar heterojendir ve hem kardiyolipine karşı hem de kardiyolipine bağlı proteinlere karşı antikorları içerir (36).

Kardiyolipin mitokondrinin içteki membranında yer alır, fosfat taşınmasında görev alır, sitokrom oksidaz aktivitesinde yer alır (40).

Kardiyolipin'den başka fosfotidik asid fosfotidilserin gibi diğer anyonik fosfolipidlerin karışımından yararlanılarak, hazırlanan antijenler sayesinde bu fosfolipidlere bağlanan proteinlere karşı antikorların saptanması sağlanabilir (41). Bu fosfolipidler hücre membran yapısında yer alırlar (42).

## ANTİFOSFOLİPİD ANTİKORLAR :

Antifosfolipid Antikorlar lupus antikoagülan çalışmaları, antikardiyolipin çalışmaları ve sifilize özel serolojik testlerle ortaya çıkarılabilen antikorlardır. Bu terim, tartışmanın kolaylığı açısından kullanılacaktır, ancak bu açıklamaları bazı fosfolipid-bağlayan proteinlere karşı da kullanılabileceği iyice anlaşılmaktadır (36).

### *ANTİFOSFOLİPİD ANTİKOR SENDROMU :*

Orta veya yüksek düzeyde antifosfolipid otoantikörlerin arteriel tromboz, venöz tromboz, tekrarlayan fetal kayıp veya trombositopeni ile ilgili oluşu "Antifosfolipid Antikor Sendromu" olarak bilinir. Sendrom, sistemik lupus eritematosus veya ilgili bir otoimmün hastalığı olanlarda sıklıkla görülür. İlgili bir otoimmün hastalık olmadığı halde, ortaya çıkmışsa, "primer Antifosfolipid Antikor Sendromu" olarak adlandırılır. Sifiliz olan hastalardaki Antifosfolipid Antikorlar sifilizin serolojik testlerinde ve Antikardiyolipin çalışmalarında saptanabildiği halde Antifosfolipid sendromuyla ilgileri yoktur.

## FOSFOLİPİDE BAĞLANAN PLAZMA PROTEİNLERİNE KARŞI OTOANTİKORLAR :

Bu geniş kapsamlı terim, Antifosfolipid Antikorların dışında lupus antikoagülanı veya antikardiolipin çalışmaları ile saptanamayan diğer fosfolipide bağlanan proteinlere karşı olan diğer antikorları ; örneğin, Protein C ve Protein S 'ye karşı olan antikorları da kapsar. Bu son söylenen antikorlar Antifosfolipid Antikorlarla ilişkili görülmekte olup, patolojik öneme sahip olabilir. Bu deyim, antifosfolipid antikor sendromu ile ilgili olan otoantikörlerini daha doğru ifade eder. Tablo - 4 'de Fosfolipide bağlanan proteinler antijenik hedef olarak bilinmekte ve Antikardiolipin ve lupus antikoagülan çalışmalarında bu proteinlere karşı otoantikörlerin reaktivitesi bulunmaktadır.



Tablo - 4 : Otoantikörlerle oluşan trombozis mekanizmaları :

Antikor	Mekanizma
Anti- $\beta_2$ GPI	<ul style="list-style-type: none"><li>-Protein C aktivasyonunun inhibisyonu</li><li>-Protein C/Protein S yoluyla faktör V a ve VIII a'nın inaktivasyonunun inhibisyonu.</li><li>-Faktör XII/Prekallikrein yoluyla oluşan fibrinolitik aktivitenin inhibisyonu.</li><li>-Heparan sülfat yoluyla Antitrombin III aktivasyonunun inhibisyonu.</li><li>-Trombosit aktivasyonunun artması</li><li>-Trombositlerce faktör X 'a yapınımının artması</li><li>-<math>\beta_2</math> GPI ve C 4 b binding Protein'in etkileşiminin inhibisyonu sonucu serbest Protein S, düzeylerinin azalması</li></ul>
Anti-Protrombin/ Antitrombin	<ul style="list-style-type: none"><li>-Trombinle aktive olan trombositlere bağlanma</li><li>-Trombin yoluyla endotel hücreden prostasiklin salınımının inhibisyonu</li><li>-Protein C aktivasyonunun inhibisyonu</li></ul>
Anti-Protein C	<ul style="list-style-type: none"><li>-Protein C aktivasyonunun inhibisyonu</li><li>-Protein C / Protein S yoluyla V a ve VIII a'nın inaktivasyonunun inhibisyonu</li></ul>
Anti-Protein S	<ul style="list-style-type: none"><li>-Protein C / Protein S yoluyla V a ve VIII a'nın inaktivasyonunun inhibisyonu</li></ul>
Anti-Fosfolipaz A2	<ul style="list-style-type: none"><li>-Endotel hücrede prostasiklin yapımının inhibisyonu</li></ul>
Anti-Trombomodulin	<ul style="list-style-type: none"><li>-Protein C aktivasyonunun inhibisyonu</li></ul>
Anti-vasküler heparansülfat proteoglikan	<ul style="list-style-type: none"><li>-Heparan sülfat yoluyla antitrombin III aktivasyonunun inhibisyonu</li></ul>

## FOSFOLİPİD MODELİN YETERSİZLİĞİ :

Son zamanlara kadar Antifosfolipid Antikorların anyonik fosfolipidlere karşı olduğu ve bu spesifitelerinden dolayı, fosfolipid bağımlı reaksiyonları inhibe ettiklerine inanılıyordu. Ancak, bu model günümüz laboratuvar testlerinde gözlenen Antifosfolipid otoantikor alt gruplarını veya Antifosfolipid Antikor Sendromunun klinik heterojenitesini yeterince açıklayamamaktadır.

Laboratuvarda sifiliz olan hastaların serumları antikardiolipin çalışmasında sıklıkla reaksiyon verir. Ancak, lupus antikoagülan aktivitesi göstermezler. Buna karşılık hastaların bazısında antikardiolipin antikorlar ve lupus antikoagülanlarından biri bulunup, diğeri bulunmadığı halde otoimmün hastalığı olanlarla yakından ilişkidirler. Bazı hastalarda antikardiolipin antikorlar ve lupus antikoagülanları aynı antikor topluluğu olduğu halde diğer hastalarda her ikisi de farklı olup, ayırdedilebilir.

Daha önemlisi, antifosfolipid sendromunun klinik görünümünün değişkenliğinin temelinde ne olduğu iyice anlaşılamamıştır. Bu antikorların antijenik özellikleri nedeniyle patojenik olduğu düşünüldüğünde neden bazı hastaların venöz tromboz, bazılarının arteriel tromboz, bazılarının trombositopeni, bazılarının fetal kayıp veya bu görünümün birleşimini sergilediği açıklanamamıştır. Aynı zamanda, Antifosfolipid Antikor bulunan bireylerin sadece % 30 'unda klinik sendrom gelişmekte olup, daha yüksek antikor düzeyleri ile daha fazla risk arasında ilgi vardır.

## FOSFOLİPİDE BAĞLANAN PLAZMA PROTEİNLERİNE KARŞI ANTİKORLARIN ÖZELLİKLERİ :

$\beta_2$  Glikoprotein I ( $\beta_2$  GPI) : 50 KD 'luk bir protein olup, normal plazmada  $\sim 200 \mu\text{g/ml}$  düzeyinde bulunur. Fizyolojik rolü bilinmediği halde, in vitro elde edilen bilgilere göre,  $\beta_2$  GPI 'nın koagülasyonda rol oynayabileceği düşünülmektedir.  $\beta_2$  GPI anyonik fosfolipidlere bağlanır ve intrinsek kan pıhtılaşmasının kontakt fazını, adenosin difosfat (ADP) bağımlı trombosit agregasyonunu ve trombositlerin protrombinaz aktivitesini inhibe eder. Yakın zamanda elde edilen ön bilgilere göre,  $\beta_2$  GPI, Protein S ve C4 b-BP

arasındaki etkileşimi inhibe ederek, Protein C sisteminde düzenleyici rol oynayabilir.

Bu bilgiler  $\beta_2$  GPI 'in bir antikoagülan rolü oynadığını düşündürse bile, bu proteinin eksikliği trombozis için kesin bir risk faktörü değildir.

$\beta_2$  GPI aynı zamanda apolipoprotein H olarak adlandırılmaktadır. Çünkü, ortalama % 40 'ı lipoproteine bağlıdır. Ancak, diğer apolipoproteinlerle yapısal hiçbir benzerlik göstermez.

Antikardiolipin otoantikörlerin kardiolipine bağlanması için  $\beta_2$  GPI gerektiği birçok laboratuvar tarafından da gösterilmektedir. Ancak, bazı araştırmacılar  $\beta_2$  GPI 'in bu antikörlerin kardiolipine bağlanmayı arttırdığını ancak böyle bir bağlanma için şart olmadığını yazdılar.

Otoimmün antikardiolipin antikörlerin hedefleri :

- 1)  $\beta_2$  GPI
- 2)  $\beta_2$  GPI ve anyonik fosfolipidin birlikte yaptıkları kompleks
- 3)  $\beta_2$  GPI 'in fosfolipide bağlanmasıyla oluşan neo- veya kriptik fosfolipid antiijenler
- 4) neo- veya kriptik  $\beta_2$  GPI antiijenler

Protrombin : Bazı lupus antikoagülanlarının sabit veya fosfolipide bağlı protrombine karşı olacağı düşünülür.  $\beta_2$  GPI 'e karşı antikörlerin tartışmasının yanısıra, bu antikörler protrombinin anyonik fosfolipide bağlanmasıyla oluşan kriptik veya neo-antiijenlere karşı olabilir veya sabit protrombine karşı eşdeğerli olarak bağlanan düşük afiniteli antikörler olabilir. Bu antikörlerin dolaşımında protrombine bağlanması, protrombin içeren immün komplekslerin yapımına ve temizlenmesine yol açar. Protrombine bağlanan bazı antikörlerin aynı zamanda trombine bağlanıp, bağlanmadığı bilinmemektedir.

Protein C ve Protein S : Sınırlı bilgi ile otoantikörlerin Protein C sisteminin elemanlarına yani Protein C ve Protein S 'ye karşı otoantikörlerin olabileceği düşünülmektedir. Bu antikörler standart antikardiolipin veya lupus antikoagülan çalışmalarıyla gösterilemediği halde burada antifosfolipid antikörler daha geniş kapsamlı olarak ele alındığında, fosfolipide bağlanan plazma proteinlerine karşı antikörler olduğu söylenebilir.

**Diğer potansiyel hedefler :** Antifosfolipid antikorların tromboza predispoze olabileceği, potansiyel bir mekanizma olarak endotel hücrelerinin prostasiklin yapımının inhibisyonu olabileceğini göstermektedir. Vermylen ve Arnout, bu antikorların fosfolipaz A2-fosfolipid kompleksine karşı olabileceğini ileri sürdü. Bu hipotezle ilgili bir zorluk şudur : Fosfolipaz A2 fonksiyonu araşidonik asid salınımını hücre içinde düzenler (yani sitozolde veya plazma membranının içteki zarı ile ilgili olarak) ancak pankreas dışı salgısal fosfolipaz A2 'nin araşidonik asid metabolitlerinin sentezine katkıda bulunduğu da yayınlanmıştır. Günümüzde herhangi fosfolipaz A2 tipine karşı otoantikorlara ait doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır.

Annexinler membranın ekzositoz örneğindeki gibi fonksiyon görmesinde önemli rol oynadığı düşünülen kalsiyuma bağımlı fosfolipide bağlanan proteinler ailesidir. Antifosfolipid antikorların annexin V (insan plasental Antikoagülan protein I) ile potansiyel ilişkisi yakın zamanda çalışıldı. Öncelikle bir hücre içi protein olup, çok düşük düzeyde annexin V insan plazması amniyotik sıvısında ve düzenlenmiş endotel hücre kültürü ortamında saklanabilir. Hücre dışı annexin V 'in pıhtılaşmasında fizyolojik bir rol oynadığını gösteren hiçbir bilgi yoktur. Anyonik fosfolipid yüzeylerde yüksek afinitesi nedeniyle Antifosfolipid antikorların anyonik fosfolipidlere bağlanmasını annexin V in vitro bloke edebilir. Antifosfolipid antikorlar annexin V 'i tanımazlar.

**Endotel hücre yüzey proteinlerine karşı antikorlar :** Fosfolipide bağlanan plazma proteinleri olmadığı halde trombomodulin ve vasküler heparan sülfat proteoglikan tromboz kontrolündeki etkin rolleri nedeniyle potansiyel antijenik hedefler arasında yer alır. Birkaç hastada trombomoduline karşı otoantikorlar belirtilmiştir.

**Fosfolipidler :** Anyonik fosfolipidler antijenik hedefler olmadığı halde, otoantikorların fosfolipide bağlı plazma proteinlerine in vivo bağlanmasında önemli rol oynar. Tartışıldığı gibi, bu antikorlar proteinler fosfolipidlere bağlandığında, indüklenen protein komformasyonu için özgül olabilir. Bunun ötesinde antikör bağlanması antijenin yüksek düzeyde lokal konsantrasyonunu sağlamak için fosfolipid yüzeye bağlı olabilir. Böylece intrinsek olarak düşük afiniteli antikorların yüksek afiniteli olarak iki değerli bağlanmasını promote ederler.

*Yeni bir model : FOSFOLİPİDE BAĞLANAN PLAZMA PROTEİNLERİ.* Birlikte ele alındığında, son bilinenlere göre, fosfolipide bağlanan proteinler ve/veya protein-fosfolipid kompleksleri antifosfolipid otoantikörlerin hedefleridir. Hepsi olmasa da, bu otoantikörlerin bazısı klinikte antifosfolipid antikör çalışmalarında saptanabilir.

#### PATOGENETİK MEKANİZMALAR :

Eğer Antifosfolipid Antikörler antifosfolipid sendromunun patogene- zinde rol alıyorsa, tartışılan antijenik özgüllüklerin genişliği, sendromun klinik görünümlerinin çeşitliliği kadar ileri sürülen potofizyolojik mekanizmanın da çok çeşitli olabileceğine açıklık getirir. Belirli bir antijenik özgüllük ile belirli bir patofizyolojik mekanizma ve antifosfolipid sendromunun belirli bir klinik görünümü arasında bir ilişki henüz gösterilemediği halde, farklı proteinlere karşı antikörlerin farklı etkiler oluşturacağını ve farklı tipte olaylarla ilişkili olacağını düşünmek mantıklıdır (Tablo-5).

Görüldüğü gibi, ortada paradox bir durum vardır ; in vitro antifosfolipid otoantikörlerin antikoagülan etkisi olduğu halde in vivo trombozla ilgili olarak karşımıza çıkmaktadır (36).

Tablo - 5 : Antifosfolipid otoantikörlerin tromboz ve trombo- sitopeniye predispoze olduğu ileri sürülen mekanizmalar :

- 1- Endotel hücre etkileşimleri :
  - Protein C yolunun inhibisyonu
  - Prostasiklin yapımının inhibisyonu
  - Doku faktörü düzeyinin artması
  - Antitrombin III aktivitesinin inhibisyonu
  - Fibrinolizisin bozulması
  - Trombosit aktive eden faktörün yapımının artması
- 2- Trombosit etkileşimleri :
  - Trombositopeni
  - Trombosit aktivasyonu üzerine etkileri

APA sendromu genellikle izole sinir sistemi semptomatoloji siyle birlikte ortaya çıktığı halde başka bulgular da olabilir. Örneğin, hafif derecede bir trombotik vaskülopati birçok organ sistemlerinin damarlarını içerebilir, özellikle deri, kalp ve akciğerleri. Görünüm genellikle sistemik vaskülitini düşündürür. Yükselmiş APA düzeylerinin görüldüğü durumlarda bazıları livedo retikülaris, migren, endokardial hastalık, pulmoner hipertansiyon, inme, epilepsi, kore, lupoid skleroz, multi-infarakt demanstır. Serumda yüksek APA bulunan kadınlarda görülen tekrarlayan düşüklerde nedenin tromboza sekonder plasental infarktüs olduğuna dair bugün ayrıntılı deliller vardır (43).

Fetal allograftın yaşaması immünolojik bir ikilem olmaya devam etmektedir. Maternal-fetal yüzeylerdeki immünolojik olayların lokal olarak düzenlenmesi birinci derecede önemli görünmektedir. Fetüsün yaşamasını devam ettirmek için önemli görülen faktörler arasında :

- 1- Fetal / trofoblast antiijenlerin yapısı ve miktarı ;
- 2- Anne rahmine düştüğü andan itibaren anne tarafından immünolojik olarak nasıl tanındığı (kalite ve miktar açısından) ;
- 3- Plasental immünoregülatuar maddeler ; ve
- 4- Fetal / desidual supresör faktörler yer alır (44).

Plasentaya ait damarlarda sıklıkla tromboza rastlanabildiği gibi, damarların tıkanıklığı durumu, tekrarlayan fetal kayıplarda dolaşım daki LA inhibitörleri arasındaki ilişkiyle açıklanabilir. Yakın zamanda birçok araştırmacı PC / PS sistemine ait antikoagülan eksikliğinin özellikle plasental sistemle ilgili olası bir tromboz mekanizmasına yol açacağını buldular.

LA pozitif olan gebe kadınlarda PS aktivitesi düşebilmektedir, bazen de çok düşük düzeylere inebilir (< % 30). Bu, plasentada trombotik olayların gelişmesi için yüksek risk oluşturur ; bu riski belirlemede fonksiyonel PS aktivitesi, yararlı bir belirleyici olarak kullanılabilir. Gebeliğin başarıyla sonlandırılabilmesi için PS aktivitesi izlemi önerilmektedir (45).

Preeklampsik durumlarda Protein C düzeyleri düşük bulunmaktadır. Özellikle Antifosfolipid Antikorları pozitif olan kadınlar preeklampsi ve gebelik toksemisi geçirmeye adaydır. Gebe likte ve kontraseptif alan kadınlarda bu doğal antikoagülan seviyelerinin düşük oluşu, Antifosfolipid Antikorları pozitif olan kadınlarda trombozis gelişmesine önemli bir ilave faktör olabilir (1).



## MATERYAL VE METOD

### MATERYAL:

Bu çalışmada, doğuran yaş grubunda olduğu halde, en az iki kez ve daha fazla düşük veya ölü doğum yapmış olup, bu şikayetle SSK Göztepe Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği İnfertilite Polikliniği'ne 1995 Mart-Kasım ayları arasında başvuran ve sekonder infertilite tanısıyla izlenmekte olan 45 kadın, hasta grubumuzu oluşturdu. Kontrol grubunu oluşturan 30 kadın, yine doğurgan yaş grubundan, hiçbir klinik şikayet ve bulgusu olmayan, hiç düşük yapmamış ve en az bir tane sağlıklı çocuğu olan, hastane personeli olan kadınlardı. Her kadın için kısaca sistemik ve obstetrik öykü olarak genel fizik muayene yaparak, hasta bilgi formu dolduruldu.

Polikliniğe başvurmuş olan hastaların sabah 08:30 - 10:00 saatleri arasında, aç karınla turnike yardımıyla, 20 cc'lik enjektör kullanılarak venöz kan örneği elde edildi. Aynı gün idrar örneği alındı.

Alınan kan örneğinden, 4.5 cc kan, 0.5 cc 0.109 M (%3.2'lik) trisodyum sitrat bulunan tüpe konularak, tüp altüst edildi, daha sonra 2.500 g gücünde 10 dakika santrifüj edildi ve plazma örneğinden 1 cc kadarı ayrı bir plastik tüpe konularak, üzeri kapatıldı. Bu örnekler, -20°C derecede bir ay süreyle dondurularak, saklandı. Bu plazma örneğinde, Antifosfolipid Antikor varlığı, total Protein S ve serbest Protein S düzeyleri araştırıldı.

Kan örneği almadan önceki, son bir hafta içinde hiçbir ilaç almadıkları (oral kontraseptif dahil), cerrahi girişim yapılmadığı konusunda emin olduğumuz zaman, hastaların gelmesi sağlandı. Hiçbirinde sistemik lupus eritematosus düşündürebilecek belirli bir klinik bulguya rastlanmadı. Klinik muayene ve yapılan rutin analizlerle (serumda üre, kreatinin, ürik asit, SGOT, SGPT, LDH, GGT, alkalen fosfataz, protein, albumin, globulin, açlık kan şekeri, hemogram, sedimantasyon, tam idrar analizi sonuçlarına dayanarak) hastalarda karaciğer-böbrek fonksiyonlarının iyi olduğunu düşündük, akut ve kronik enfeksiyon lehine bir bulgumuz yoktu. APTT, protrombin zamanı, hemogram, sedimantasyon, VDRL, ANTI-nDNA ölçümleri Merkez Bakterioloji Laboratuvarında yapıldı.

**METOD:***RUTİN ANALİZLER:*

- 1) Şeker, üre, kreatinin, SGOT, SGPT, LDH, GGT, alkaleen fosfataz, protein, albumin miktar tayinleri RA-XT otoanalizöründe yapıldı
- 2) Standart APTT, Protrombin zamanı ölçüleri otomatik koagülometre aletiyle; hemogram otomatik kan sayımı aleti ile, eritrosit sedimentasyonu yine otomatik olarak bakıldı.
- 3) VDRL, anti-nDNA lam aglutinasyon metodlarıyla bakıldı





### PROTEİN S ÇALIŞMASI :

Plazmada total Protein S ve serbest Protein S antijenik düzeylerinin belirlenmesinde ELİSA metodu kullanıldı.

- Testin prensibi: Tavşana ait anti Protein S antikoruna ile kaplı plastik kuyucukların içine plazma örneği konularak, plazmadaki Protein S'nin buradaki antikorlarla bağlanması sağlanır. Daha sonra peroksidaz ile birleştirilmiş anti-Protein S antikoruna ilave edildiğinde, burada daha önceden bağlı olan Protein S'ye bağlanarak, sandviç oluşması sağlanır. Hidrojen peroksit varlığında substrat olan orto-fenilendiamin (OPD) üzerinde peroksidaz enziminin aktivitesi gözlenir ve belirtilen süre sonunda reaksiyon kuvvetli bir asitle durdurularak, oluşan rengin abzorbansına bakılır ve Protein S düzeyi belirlenir (Şekil - 4).

### - Reaktifler ve hazırlanması :

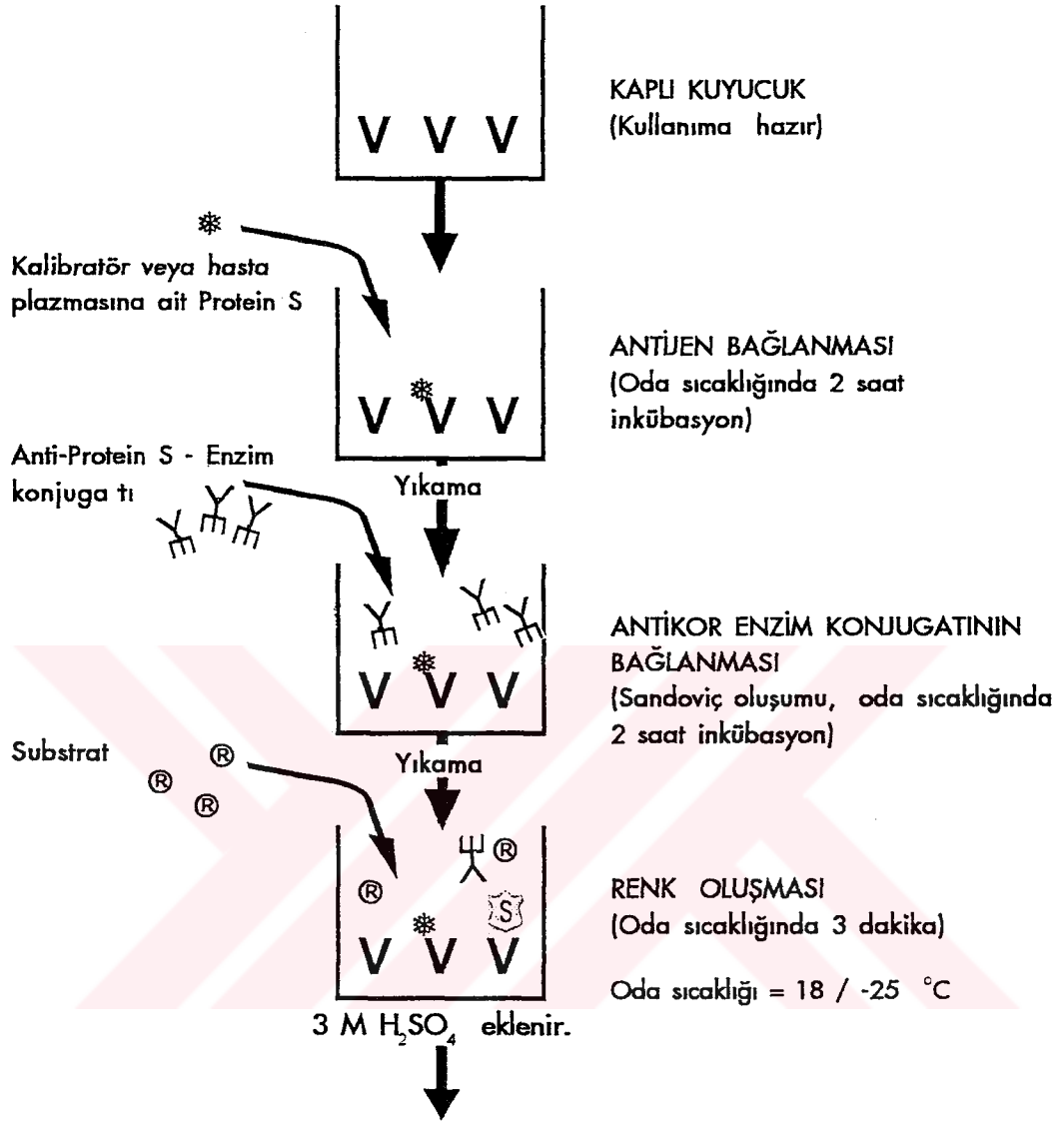
R-1 : Alüminyumla paketlenmiş kullanıma hazır halde her birinde 16 tane kuyucuk bulunan iki strip (toplam 32 kuyucuk) içerir. Bu kuyucuklar anti-human Protein S F(ab) fragmanları ile kaplıdır. Kullanmadan hemen önce alüminyum paket açılarak, stripler ortaya çıkarıldı.

R-2 : peroksidaz enzimiyle birleştirilmiş tavşana ait spesifik anti-human Protein S antikoruna içerir. Kullanımdan hemen önce liyofilize haldeki R-2 içine (hazırlanmış olan) R-4'ten 8 ml konularak, hazır hale getirildi.

R-3 : 2 mg orto-fenilendiamin (OPD, 2 HCL) içeren tabletlerden kullanımdan hemen önce iki tablet 8 ml distile su ile iyice çözüldü. Laboratuvarımızda bulunan % 35'lik Hidrojenperoksit 1 : 5 oranında sulandırılarak, % 7'lik Hidrojenperoksit elde edildi. 20 µl % 7'lik Hidrojenperoksit OPD tabletlerini çözdüğümüz sıvıya eklendi. Bu OPD / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu hazırlanırken, en çok dikkat edilmesi gereken nokta : herhangi bir yabancı madde veya elle kontaminasyon olmaması sağlanmalıdır. Daha önce kullanılmamış bir tüp tercih edilmeli ve suyun iyi distile edildiğinden emin olunmalıdır.

R-4 : Fosfat tamponu konsantre halde bulunduğundan, distile su ile on katı sulandırılır.

R-5 : Konsantre yıkama solüsyonu alıp, distile su ile yirmi katı sulandırılır.



- 492 nm 'de optik densite olunur.
- V** Tavşan Anti-Protein S F (AB ) 2 fragmanı kaplı kuyucuk.
- \*** Kalibratör veya hasta plazmasına ait Protein S.
- Y** Tavşan Anti-Protein S - Peroksidaz konjugatı.
- ®** Hidrojen peroksid eklenmiş orto-fenilendiamin substratı.
- S** Substrat renkli ürüne dönüşür.

Şekil - 4 : Şematik olarak, Protein S (ELISA) çalışmasının basamakları.

R-6 : Liyofilize halde olup, 0.5 cc distile su ile çözüldüğünde, % 100 dolayında total Protein S içeren insan plazması içerir.

R-7 : % 25 polietilen glikol içeren hazır solüsyondur:

- Bu kitin kapsamında olmadığı halde, Laboratuvardan karşılanan diğer gereksinimler şunlardır :

1) Protein S kontrol plazması, liyofilize olup, 0.5 cc distile su ile çözüldüğünde, % 100  $\pm$  10 düzeyinde Protein S içermektedir.

2) 1M Hidroklorik asid % 37 'lik HCl 'den hazırlandı.

3) Multikanal pipetör

4) ELP 40 yıkayıcı (Biotek) otomatik plate yıkama aleti

5) 311 SX okuyucu (Biotek) plate okuma aleti

#### TESTİN YAPILIŞI :

1- İlk önce serbest Protein S 'yi bağlı olan Protein S 'den ayırmak amacıyla 300  $\mu$ l plazma örneği üzerine 50  $\mu$ l reaktif 7 eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı. 30 dakika su-buz karışımında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 dakika süre ile 3,000 g gücünde santrifüj edildi. Böylece, C4b-BP 'ye bağlı halde olan Protein S çöktürülürken, serberst Protein S süpernatant içinde kalmış oldu.

2 - Reaktif 6 (hazırlanmış R4 kullanılarak) 1 : 101 oranında sulandırıldı. Böylece, en yüksek " t " değerine sahip kalibratör elde edilmiş oldu. Yine R-4 kullanılarak, t/2, t/4, t/8, t/16 kalibratörleri elde edildi. Protein S kontrol plazması ve hasta plazmaları ve PEG ile çöktürme işlemi uygulanan plazmaların süpernatantları aynı uygulamayla 1:101 oranında R-4 kullanılarak, sulandırıldı.

3 - Reaktif körü olarak R-4 ilk iki kuyucuğa, hazırlanan kalibratörler sırasıyla t, t/2, t/4, t/8, t/16, Protein S kontrol plazması ve hasta plazmaları sulandırılmış halde önceden belirlenen kuyucuklarına, 200  $\mu$ l miktarında konuldu ve 2 saat süreyle 18-25 C derecede, üzeri kapatılarak, inkübasyona bırakıldı.

4 - R-5 ile her seferinde 300  $\mu$ l kullanılarak, 5 kere kuyucuklar yıkandı. Antikorla bağlanabilen Protein S 'nin kuyucuklarda kalmasına izin verilirken, bağlanamayan Protein S de ortamdan uzaklaştırılmış oldu.

5 - Multikanal pipetör yardımıyla, 200  $\mu$ l R-2 her bir kuyucuğa konuldu ve tekrar 2 saat inkübasyona bırakıldı. Buradaki immünokonjugatın daha önce bağlanmış halde bulunan Protein S antijenine bağlanması sağlandı.

6 - Reaktif 5 ile 5 kere otomatik yıkama yapıldı. Bu arada, bağlanamayan immünokonjugat ortamdan uzaklaştırıldı.

7 - Multikanal pipetör yardımıyla OPD / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200 µl olmak üzere kuyucuklara koyuldu ve 3 dakika inhübasyona izin verildikten sonra 100 µl miktarında 1 M HCl 'den her bir kuyucuğa koyularak, reaksiyon durduruldu. 10 dakika beklendi ve 492 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı abzorbanları okundu.

- Değerlendirme logaritmik kağıt üzerinde (%) kalibratör değerleri x eksenini üzerinde ve karşılığı olan abzorban değerleri y eksenini üzerinde olacak şekilde işaretlenerek, kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil - 5).

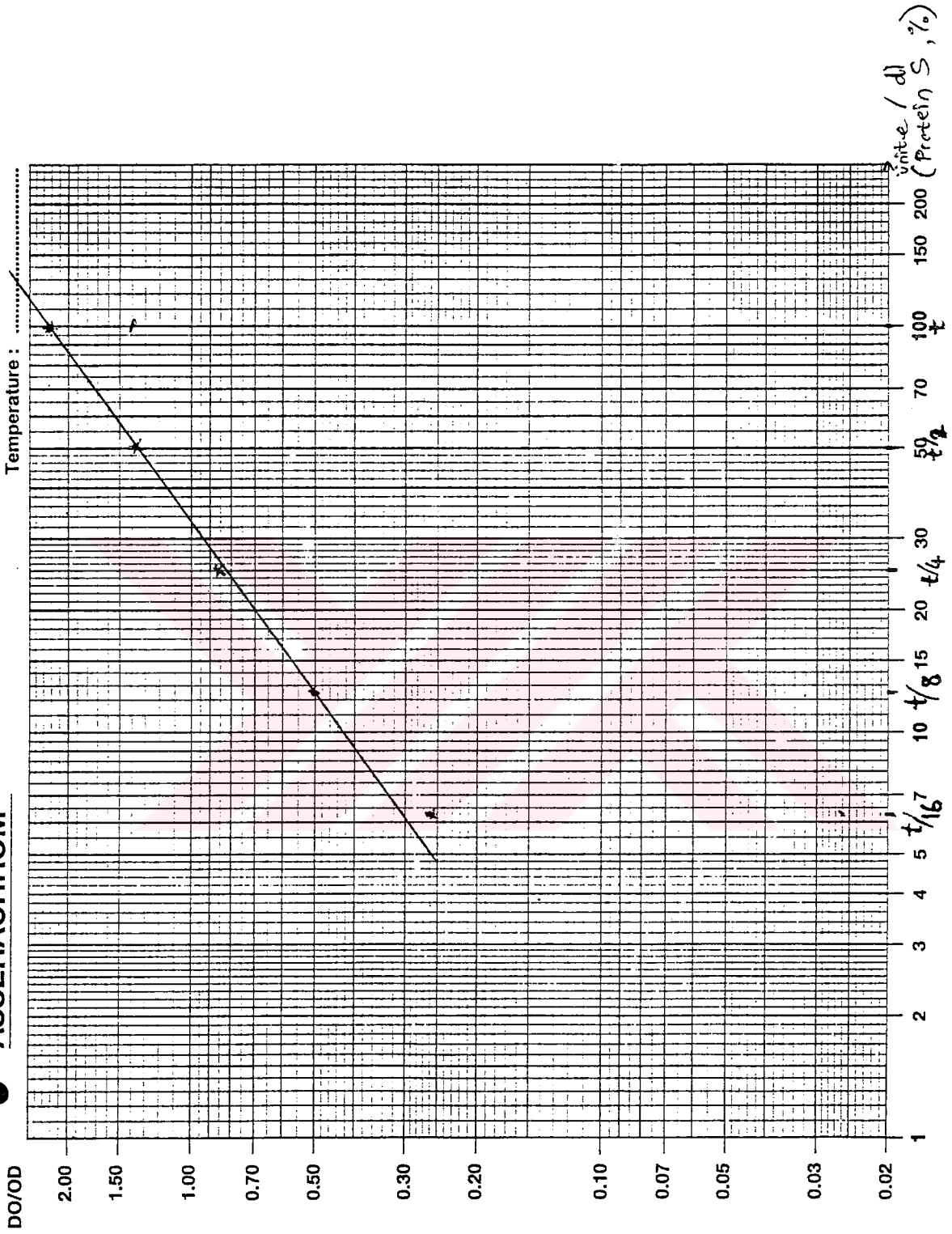
PS kontrol plazması (100 ± 10) ilk çalışmamızda % 90 'a karşılık gelen abzorban değeri verirken, ikinci çalışmada % 95 'e karşılık gelen abzorban değeri verdiği için çalışmamızın doğruluğundan emin olduk.

Total Protein S 'nin normal aralığı % 70-140 ünite iken, serbest Protein S 'nin normal aralığı % 28-52 ünite olarak verildi. Buna göre, hasta plazmalarının total Protein S ve serbest Protein S düzeyleri belirlendi ve sonuçlar verildi.

5



Date: .....  
Lot: .....  
Temperature: .....



Şekil - 5 : t, t/2, t/4, t/8, t/16 kalibratörlerini kullanarak, elde ettiğimiz Protein S kalibrasyon eğrisi.

### ANTİFOSFOLİPİD ANTİKOR ÇALIŞMASI :

Plazmada Antifosfolipid Antikor varlığını araştırmak amacıyla ELISA metodu kullanılmıştır.

- **Testin prensibi** : Anyonik fosfolipidlerle kaplı kuyucuklara plazma koyularak, plazmada var olan Antifosfolipid Antikorların fosfolipidlere tutunması sağlanır. Daha sonra insan Ig G, Ig M, Ig A'sına karşı keçide geliştirilmiş antikorlar peroksidaz enzimi ile birleştirilmiş olduğu halde, bağlanmış halde duran Antifosfolipid Antikorların antijenik belirleyicilerine bağlanır. Sandoviç tekniği uygulanmış olur. Hidrojenperoksit ve ortofenilendiamin varlığında enzim aktivite gösterir. Belli bir süre sonra kuvvetli bir asitle reaksiyon durdurulur ve rengin abzorbanası okunur.

#### - **Reaktiflerin hazırlanması** :

**R-1** : alüminyum paket içinde kullanıma hazır halde bulunan fosfolipidlerle kaplı kuyucuklardan her bir stripte 16 tane bulunur.

**R-2** : insan Ig G, Ig A, Ig M antikorlarına karşı keçide elde edilen antikorlar peroksidaz ile birleştirilmiştir. Kullanımdan hemen önce, her bir şişe (liyofilize) R-2 içine R-4 'den 8 ml koyularak, çözünmesi sağlandı.

**R-3** : Her bir tablette 2 mg ortofenilendiamin (OPD, 2HCL) bulunmaktaydı. *OPD / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu Protein S çalışmasında anlatıldığı gibi hazırlandı.*

**R-4** : Kullanıma hazır fosfat tamponu içermektedir.

**R-5** : Konsantre yıkama solüsyonu olup, kullanımdan önce distile su ile 20 katı sulandırıldı.

**R-6** : Liyofilize halde insan plazması olup, 2 cc R-4 ile çözündüğünde, 100 PL ünite / ml kadar APA içermektedir.

**R-7a**: Liyofilize halde bulunan normal insan plazması olup, 2 cc R-4 ile çözündüğünde negatif kontrol elde edildi.

**R-7b**: Liyofilize halde bulunan belli miktarda APA içeren insan plazmasıdır. 2 cc R-4 ile çözerek, kontrol plazması olarak kullanıldı.

#### TESTİN YAPILIŞI :

1- Kalibratörlerin hazırlanması amacıyla R-6 " t " değeri kabul edilerekten, R-4 sulandırma reaktifi olarak kullanıldı ve t/2, t/4, t/8, t/16 kalibratörleri elde edildi. Reaktif 7a ve 7b için herhangi bir sulandırma gerekmedi. Hasta plazmaları R-4 kullanılarak, 1 : 101 oranında sulandırıldı.



2- Reaktif körü olarak R-4 kullanılmak üzere sırasıyla kalibratörler, kontroller ve sulandırılmış hasta plazmalarında 200 µl uygun kuyucuklara koyuldu. Tam 30 dakika oda sıcaklığında (18-25 derece) inkübasyona bırakıldı.

3 - *Protein S çalışmasında yaptığımız gibi*, R-5 ile 5 kere olmak üzere otomatik yıkama sağlandı.

4 - Daha sonra R-2 'den 200 µl kuyucuklara koyuldu ve yine tam 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

5 - OPD / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 200 µl koyduktan sonra tam 6 dakika süren inkübasyon sonunda, Laboratuvarımızda hazırladığımız 1 M HCl solüsyonlarından 100 µl her bir kuyucuga koyarak, reaksiyona son verildi. 10 dakika beklendi ve 492 nm dalgaboyunda reaktif körüne karşıc abzorbanları okundu.

#### Değerlendirme :

Kalibratör değerleri logaritmik grafik kağıdı üzerinde APA düzeyleri x eksenine, karşılıkları olan abzorban değerleri y eksenine göre bulunup, işaretlendi (Şekil - 6). Kalibrasyon eğrisi üzerinden hasta plazmalarının APA düzeyi belirlendi. Reaktif 7a, 5 PL ünite/ml altında APA içerdiğinden, "negatif kontrol" olarak verilmiştir. Reaktif 7b, 5-15 PL ünite/ml arasında APA içerdiğinden, "pozitif kontrol" olarak verilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinde her iki kontrol örneği de belklenen abzorban değerlerini verdi. İlk çalışmamızda 7a kontrol reaktifi 1.7 PL ünite/ml, 7b kontrol reaktifi 11 PL ünite/ml APA düzeylerine karşılık geldi. İkinci çalışmamızda 7a kontrol reaktifi 2.3 PL ünite/ml, 7b kontrol reaktifi 13 PL ünite/ml APA düzeylerini verdi. Bu değerler, çalışmamızın doğruluğunu gösterdi.

5 PL ünite/ml altındaki APA düzeyleri negatif kabul edilip, bunlar "normal plazma" olarak değerlendirildi.

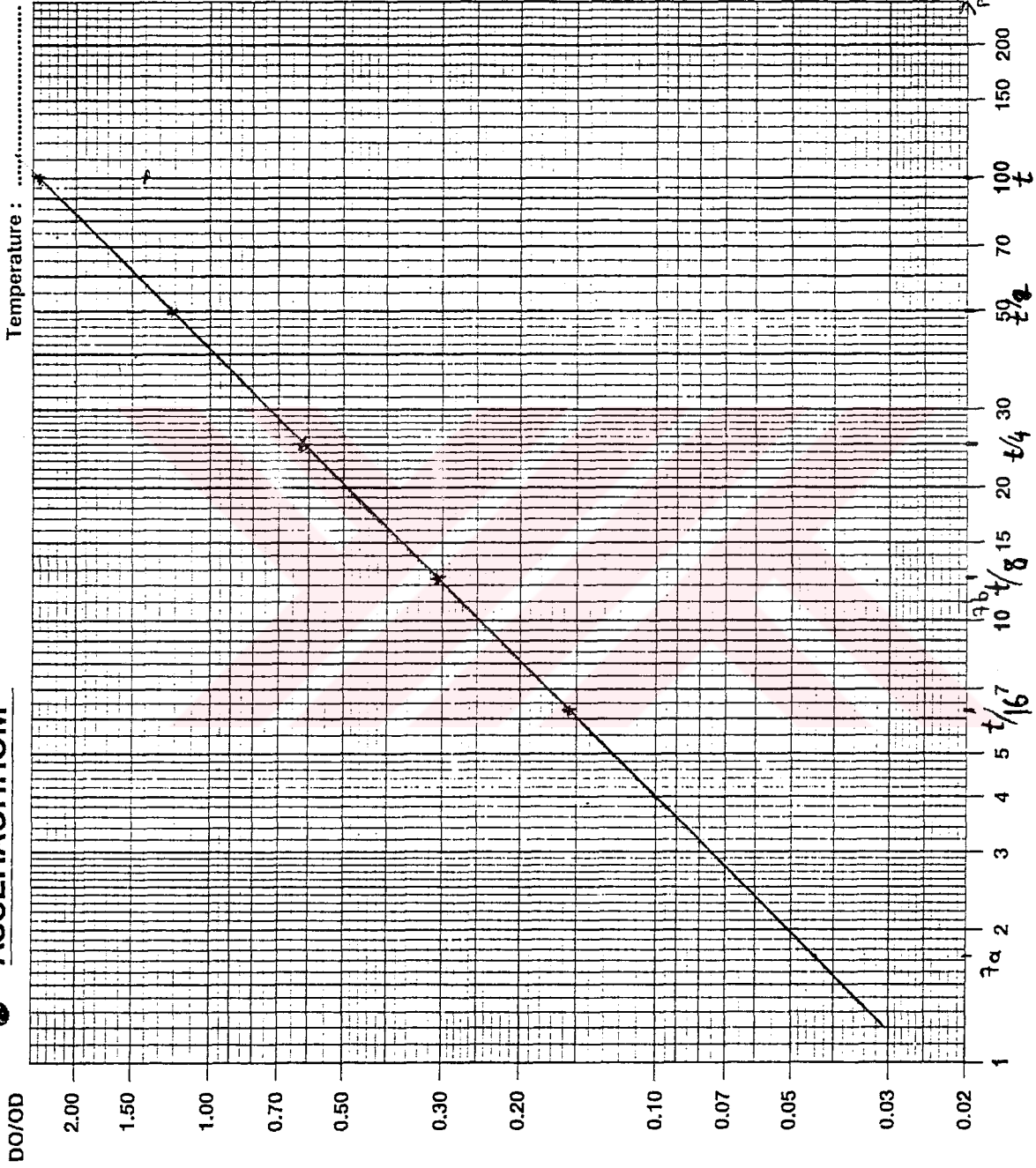
5-15 PL ünite/ml arasında APA düzeyleri bulduğumuzda sınırda pozitif (borderline) olduğu için hastadan tekrar kan alındı, test edildi, aynı sonucun çıkması üzerine, bu düzeyde APA bulduğumuz plazmaları bir pozitif kabul edip, "hafif düzeyde APA pozitifliği" olarak değerlendirdik.

APA düzeyi 15 PL ünite/ml üzerinde bulduğumuz plazmaları iki pozitif kabul edip, "orta düzeyde APA pozitifliği" olarak değerlendirdik.

5

Date : .....  
Lot : .....  
Temperature : .....

ASSERACHROM®



Şekil - 6 :  $t$ ,  $t/2$ ,  $t/4$ ,  $t/8$ ,  $t/16$  kalibratörlerini kullanarak, elde ettiğimiz Antifosfolipid Antikor kalibrasyon eğrisi.



## BULGULAR

Bu çalışmada yaş ortalaması  $33.93 \pm 3.39$  (26-40) olan 30 sağlam kadın ve yaş ortalaması  $29.95 \pm 6.31$  (19-46) olan sekonder infertilite ile izlenen 45 kadına ait plazmada total Protein S, serbest Protein S ve Antifosfolipid Antikor düzeylerine bakıldı (Tablo 6).

Normal olgularda ortalama total Protein S düzeyi  $87.07 \pm 10.32$ , hasta olgularda ise,  $91.53 \pm 12.13$  olup; iki grup karşılaştırıldığında, Student's t testine göre, arada anlamlı bir fark bulunamadı (t: 1.66, p: 0.102).

Normal olgularda ortalama serbest Protein S düzeyi  $39.47 \pm 5.46$ , hasta olgularda ise,  $42.18 \pm 7.36$  olup; iki grup karşılaştırıldığında, Student's t testine göre, arada anlamlı bir fark bulunamadı (t: 1.72, p:0.089).

Normal olguların 3'ünün plazmasında hafif düzeyde APA pozitifliği gözlemlendi (%10). Sekonder infertilite şikayeti nedeniyle izlenen 45 kadından 22'sinin (%49) plazmasında hafif veya orta düzeyde APA pozitifliği gözlemlendi. Hafif düzeyde APA pozitifliği 19 olguda (%42) görülürken, orta düzeyde APA pozitifliği 3 olguda (%7) gözlemlendi (Tablo 7).

Yaş Grupları	Normal	Hasta
≤ 20	–	4(%9)
21-30	6 (%20)	20(%44)
31-40	24 (%80)	19(%42)
≥ 41	–	2(%4)

**Tablo 6:** Normal olgularla, sekonder infertilite ile izlenen olguların yaş dağılımı

Normal olguların ve sekonder infertilite ile izlenen olguların plazmalarında bulunan APA varlığı karşılaştırıldığında, Student's t testine göre iki grup arasında ileri derecede anlamlı fark bulundu (t: 3.71, p<0.0001). Kontrol grubunu oluşturan olguların 3'ünde (%10), APTT

uzaması görülürken, hasta grubunun 6 olgusunda (%13) APTT uzaması görüldü. Student's t testine göre, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (t: 0.91, p:0.36). Hasta grubu incelendiğinde, APA varlığı ile APTT uzaması (>40 sn.) arasında bir ilişki bulunamamıştır (r: 0.07, p: 0.50).

Grup	Olgu sayısı	Yaş ort.	TPS ort.(%)	FPS ort. (%)	APA pozitif olan olgular	APTT uzaması görülen olgular
Normal	30	33.93±3.39	87.07±10.32	39.47±5.46	3(%10)	3(%10)
Hasta	45	29.95±6.31	91.53±12.13	43.18±7.36	22(%49)	6(%13)

**Tablo 7:** Normal olgularda ve sekonder infertilite ile izlenen olgularda ortalama total Protein S, serbest Protein S düzeyleri, APA varlığı ve APTT uzamasının karşılaştırılması

Plazmalarında hafif ve orta düzeyde APA bulunan hastaların serbest Protein S düzeyleri ortalaması %41.5±6.99 olup, kontrol grubunun serbest Protein S düzeylerinden (%39.47±5.46) yüksek bulundu. Plazmalarında orta düzeyde APA (>15 PL ünite/ml) bulunan üç hastadan ikisinde serbest Protein S düzeyleri %36 ve %35 bulunmuş olup, kontrol grubunun ortalamasından (39.47±5.46) düşüktür. 45 hastadan birinde orta düzeyde APA pozitifliği ile birlikte APTT uzaması görülmüş olup, total Protein S %76, serbest Protein S ise %35'tir (Tablo 8).

	APA (-)		APA (+)		APA (++)	
	APTT N	APTT uzamış	APTT N	APTT uzamış	APTT N	APTT uzamış
Olgu sayısı	20(%44)	3(%6)	17(%38)	2(%4)	2(%4)	1(%2)
TPS(%)	88.80±11.38	109.67±20.40	93.41±8.87	92.5±3.54	82.5±17.68	76
FPS(%)	41.7±6.54	50.33±12.86	40.82±6.81	48±2.83	44±11.31	35

**Tablo 8:** Sekonder infertilite ile izlenen olgulara alt plazmada APA varlığı ve APTT uzaması ya da normal oluşuna göre total Protein S ve serbest Protein S düzeylerinin ortalamaları

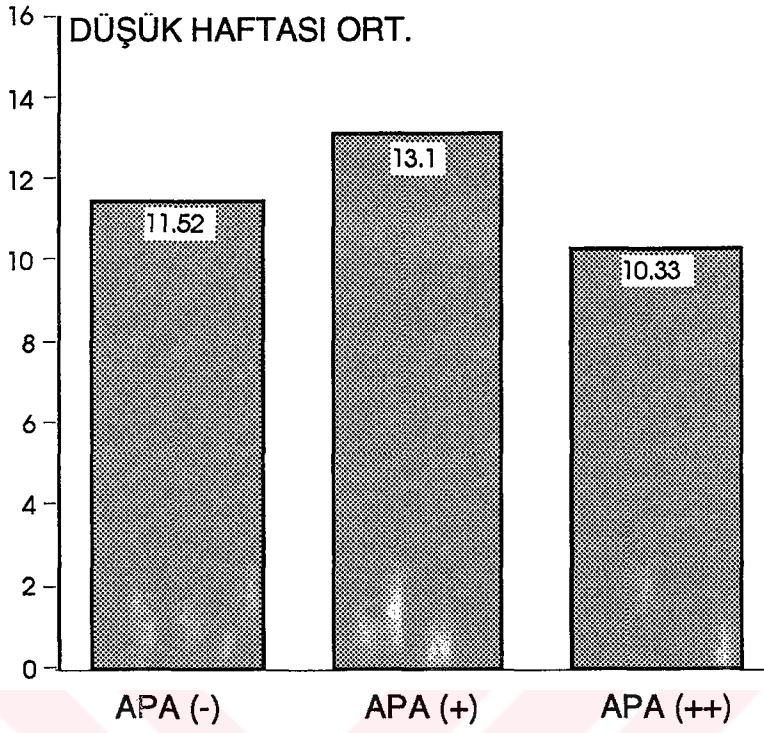
Hastaların %71'inde gözlenen ilk trimestir düşüğü olmasıydı. APA negatif olan 23 hastada düşük sayısının ortalaması 3.39±1.69, düşüklerin

gebelik haftalarının ortalaması  $11.52 \pm 3.42$  idi. APA hafif düzeyde pozitif olan 19 hastada düşük sayısının ortalaması  $3.0 \pm 1.63$ , düşüklerin gebelik haftalarının ortalaması  $13.10 \pm 6.63$  idi. APA orta düzeyde pozitif olan 3 hastada düşük sayısının ortalaması  $4.66 \pm 3.05$ , düşüklerin gebelik haftalarının ortalaması  $10.33 \pm 4.93$  idi (Şekil 7).

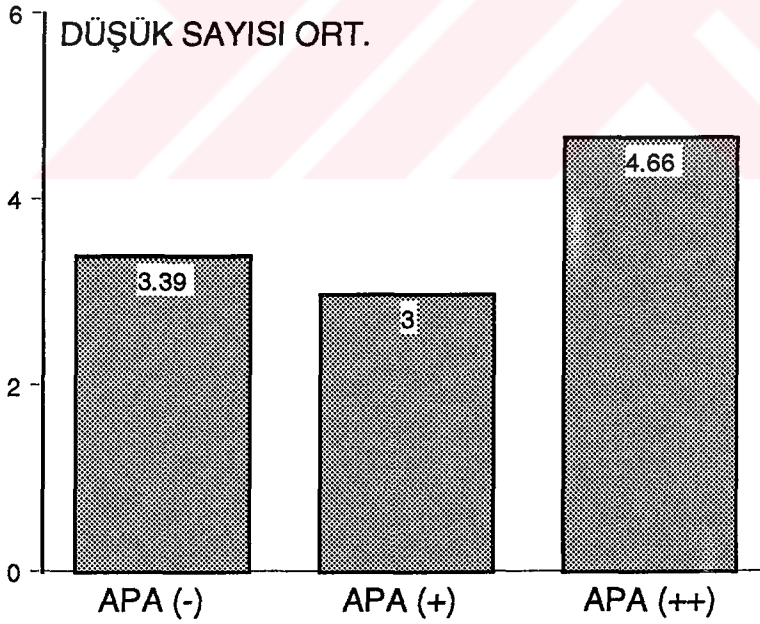
Plazmalarında orta düzeyde APA pozitif bulunan kadınların düşük sayısı ortalaması ( $4.66 \pm 3.05$ ), hafif düzeyde APA pozitif bulunan kadınların düşük sayısı ortalamasından ( $3 \pm 1.63$ ) yüksek olduğu gibi, plazmalarında APA bulunmayan kadınların düşük sayısı ortalamasından ( $3.39 \pm 1.69$ ) da yüksekti.

Plazmada APA pozitifliği ile düşük sayısı arasında bir ilişki bulunamamıştır ( $r: 0.04$ ,  $p: 0.76$ ).

Plazmalarında orta düzeyde APA pozitif bulunan kadınların düşük haftası ortalaması ( $10.33 \pm 4.93$ ), hafif düzeyde APA pozitif bulunan kadınların düşük haftası ortalamasından ( $13.10 \pm 6.63$ ) düşük olduğu gibi, plazmalarında APA bulunmayan kadınların düşük haftası ortalamasından ( $11.52 \pm 3.42$ ) da düşüktü (Şekil 8).



ŞEKİL - 7  
Antifosfolipid antikor pozitifliğine göre düşük haftası ortalaması



ŞEKİL - 8  
Antifosfolipid antikor pozitifliğine göre düşük sayısı ortalaması

## TARTIŞMA

Önceleri Antifosfolipid Antikor'un sadece antikardiolipin antikor (ACA) olduğu düşünülüyordu. Ancak, daha sonra kardiolipin dışında fosfotidilserin, fosfotidik asid gibi diğer negatif (anyonik) fosfolipidlere karşı da gelişen antikorlar olduğu bulundu. Matsuda ve arkadaşları tarafından (1994), ARA tanı kriterlerine göre sistemik lupus eritematosus tanısı almış bulunan 50 hastada ve 20 kişiden oluşan kontrol grubunda lupus antikoagülanı ve Antifosfolipid Antikorların (antikardiolipin antikor, antifosfotidil antikor, antifosfotidilinositol antikor, antifosfotidik asid antikor) düzeyleri araştırıldı. Hasta grubunda antikardiolipin antikor %32, antifosfotidil antikor %26, antifosfotidilinositol antikor %12 ve antifosfotidik asid antikor %14 oranında pozitif bulundu. Hastaların %44'ünde bu antikorlardan en az biri pozitif olarak karşımıza çıkmaktadır (31). Bu antikorların IgG, IgA, IgM izotipleri Antifosfolipid Antikor Sendromu'na neden olabilmektedir (2, 46). Biz, kardiolipin, fosfotidik asid, fosfotidilserinden oluşan fosfolipid karışımına karşı olan IgG, IgA, IgM tipi antifosfolipid antikorların düzeyini ölçebildiğimiz ELISA kiti ile çalıştık. Sadece antikardiolipin antikorları saptayabilen çalışmalara göre bu kitin spesifitesi ve sentivitesi daha yüksektir (43). Yeni modele göre, aslında bu Antifosfolipid Antikor çalışmalarında fosfolipide bağlanan proteinler veya proteinfosfolipid komplekslerine karşı olan veya bu yapıların her ikisine de karşı olan antifosfolipid antikorlar belirlenmektedir (36).

Parazzini ve arkadaşlarının (1991) tekrarlayan düşük hikayesi olan 220 kadın, 193 kontrol (kadın) üzerinde yaptıkları bir çalışmada ACA (IgG, IgM) varlığı hasta grubunda %19, kontrol grubunda %3 oranında bulundu (47). Creagh ve arkadaşlarının (1991) aynı şikayetlere sahip olan 35 kadın hasta ile yaptıkları çalışmada, %17 oranında ACA (IgG) varlığı gözlemlendi (48). Mac Lean ve arkadaşlarının (1994) 243 hasta kadın ile yaptıkları benzer bir çalışmanın sonucunda %10.2 oranında ACA pozitifliği gösterildi (48). Unander ve arkadaşlarının (en az 3 kere ve daha fazla düşük yapmış olan) 99 İsveç'li kadın üzerinde yaptıkları çalışmada olguların %42'sinde

yüksek antikardiolipin antikor düzeylerine rastlandı (47). Patrassi ve arkadaşlarının (1994) düşük yapan 64 kadın üzerinde yaptıkları çalışma sonucuna göre, antikardiolipin antikor prevalansı %48.4 olarak bulunmuştur (49). Yine Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan benzer bir çalışma sonucu %50 oranında ACA pozitifliği bulduklarını göstermektedir (49). Görüldüğü gibi değişik grupların hesapladıkları ACA prevalansı, birbirlerine pek uymamaktadır. Bizim çalışmamızda, 30 normal kadından oluşan kontrol grubumuzda %10 oranında antifosfolipid antikor (APA, IgG, IgM, IgA) pozitifliği gözlenirken iki kere ve üzerinde tekrarlayan düşük ve ölü doğum hikayesi olan 45 kadında APA prevalansını %49 bulduk.

Lockwood ve arkadaşları 737 hasta ile yaptıkları bir çalışma sonucunda APTT uzamasının düşük yapma riskini göstermede sensitivitesi düşük ancak spesifitesi yüksek bir test olduğunu buldular (31). Sensitivite ve spesifitenin artırılması için kaolin pıhtılaşma zamanı (KCT), diluted Russel Viper Venom Time (dRVVT) gibi diğer koagülasyon testleri kullanılabilir. Düşük yapan kadınlarla ilgili araştırmalarda KCT tercih edilmektedir. Hiçbir test tek başına lupus antikoagülanı bulunan hastaları belirlemede yeterli değildir. APTT testi koagülasyonun, intrinsek sistemini analiz etmek amacıyla uygulanır. APTT reaktifleri içinde bir aktivatör ve bir de fosfolipid kaynağı bulunur. Fosfolipidin konsantrasyonu, içeriği ve konfigürasyonu lupus antikoagülanının varlığını gösterecek duyarlılıkta reaktifin belirlenmesinde önemlidir. APTT reaktifindeki fosfolipidlerin konsantrasyonu lupus antikoagülanı duyarlılığı ile çok kuvvetli ilişki gösterir (37). Tunçay ve arkadaşlarının (1986-89 yılları arasında) SSK Göztepe Eğitim Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine habitüel abortus ve tekrarlayan intrauterin ölüm tanısıyla başvuran 30 kadın üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda APTT uzaması %16.6 oranında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda standart APTT testi ile hasta grubumuzda %13 oranında, kontrol grubumuzda %10 oranında pozitif sonuç alındı. Hasta grubumuzda antifosfolipid antikor varlığı ile standart APTT testi uzamış olması arasında bir ilişki bulunamamıştır.



Rossi ve arkadaşları, lupus antikoagülanı (APTT ile) pozitif bulunan 16 hastada Protein S aktivitesi (fonksiyonel düzeyi) ortalamasını kontrol grubunun ortalamasına göre belirgin olarak düşük buldu. Ancak, tek tek bakıldığında, 6 hastada fonksiyonel Protein S aktivitesi yarı yarıya düşük bulunurken, diğer 10 hastanın normal sınırlar içindeydi. Serbest Protein S (antijenik), düzeyleri açısından bakıldığında hasta grubu ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Hasta plazmaları IgG sınıfı antikorlardan arındırıldığında, APTT ile ölçülen inhibitör aktivite (lupus antikoagülanı), ortadan kaybolurken, önceden düşük bulunmuş olan Protein S aktivitesi de normal bulundu. Bu durum fonksiyonel Protein S aktivitesinin inhibisyonu nedeniyle düşük bulunmuş olabileceği gibi aynı durumun aktif Protein C (APC) direncine de bağlı olabileceği şeklinde yorumladılar (45). Bizim çalışmamızda hasta grubunda standart APTT testi pozitif olan kadınlarda serbest Protein S antijenik düzeyleri ile normal kadınların serbest Protein S düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

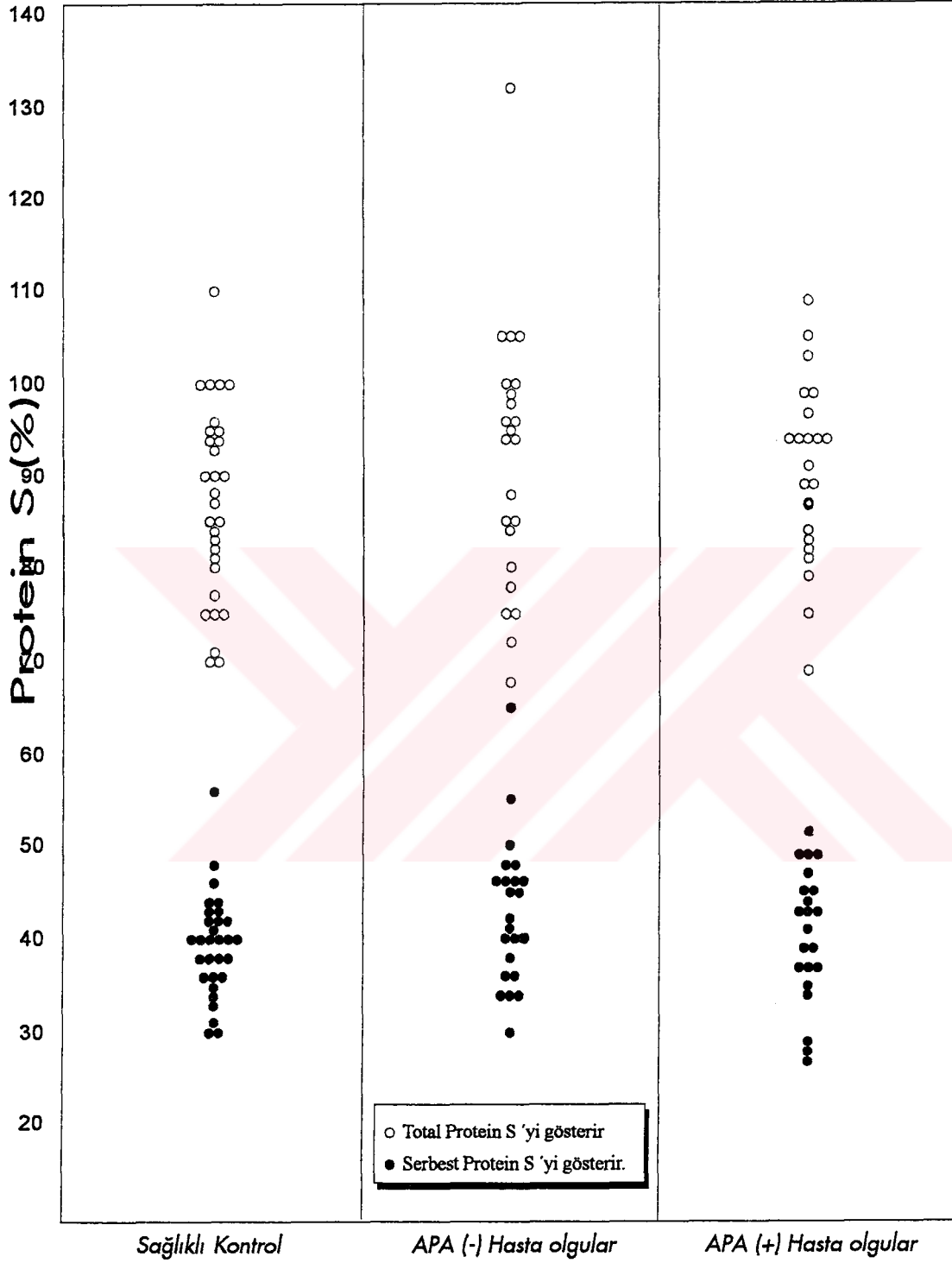
Fosfolipid antikorları pozitif olup düşük hikayesi olan 11 kadın üzerinde Parke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaların sonucuna göre 11 hastanın 7'sinde serbest Protein S (antijenik düzeyi) düşüklüğü bulundu. Kontrol grubunda serbest Protein S düzeyi ortalaması %43.7 iken, hasta olan olgularda ortalama %33.1 olup belirgin olarak düşüktür ( $P<0.02$ ) (1). Matsuda ve arkadaşları tarafından (1994) ARA tanı kriterlerine göre sistemik lupus eritematosus tanısı almış bulunan 50 hastada ve 20 kişilik kontrol grubunda lupus antikoagülanı, antifosfolipid antikorları, total Protein S, serbest Protein S, fonksiyonel Protein S ve C4 b-BP düzeyleri araştırıldı. APA pozitif bulunan hastalar, negatif bulunan hastalar ve kontrol grubunda total Protein S serbest Protein S ve fonksiyonel Protein S ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi (31). Malia ve arkadaşları lupus antikoagülanı ve ACA pozitif olanlarda IgG tipi antikorları saflaştırdıktan sonra bu antikorların Protein C/Protein S tarafından faktör V'in yıkımını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kordich ve

arkadaşları da sistemik lupus eritematosus olan hastalarda Protein S düşüklüğünü destekler sonuçlar bulundu. Antifosfolipid antikor ile birlikte Protein S bozukluğu olduğunu ileri süren birçok yazı olmasına karşılık Lo ve arkadaşları, Tsakiris ve arkadaşları, lupus antikoagülanı ve antifosfolipid antikor pozitif bulunan hastalarda Protein S ile ilgili bir bozukluk saptayamadılar (31). Bizim çalışmamızda plazmalarında hafif veya orta düzeyde antifosfolipid antikor pozitif bulunanlarla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Plazmalarında orta düzeyde APA bulunan iki olguda (APA>15 PL ünite/ml), serbest Protein S düzeyleri %36 birisinde, %35 birisinde olup, bunlar kontrol grubu ortalamasının altına düşmektedir (Şekil 9).

Serbest Protein S düşüklüğünün fetal kayıp için bir predispozisyon olduğu henüz yazılmamıştır, oysaki trombotik olaylarla ilgisi iyi bilinmektedir (1). Bizim çalışmamızda düşük yapan kadınlarda bulduğumuz serbest Protein S düzeyi ile kontrol grubunda bulduğumuz değer arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

İlk olarak Laurell ve arkadaşları yalancı pozitif VDRL testi ile lupus antikoagülan aktivitesi arasındaki ilişkiyi gösterdiler (2). VDRL testinde kardiolipin (anyonik) ve fosfotidil kolin (nötral) fosfolipidlerin karışımı (beraberinde kolesterol bir bağlayıcı olarak) kullanılır. Bizim çalışmamızda antifosfolipid antikorlarını pozitif bulduğumuz kadınların hiçbirisinde yalancı pozitif VDRL sonucuna rastlanamadı.

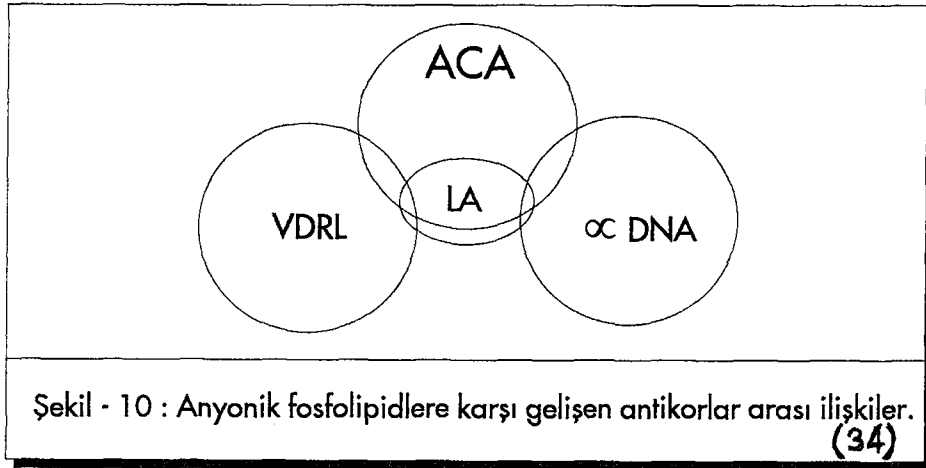
Antifosfolipid Antikorlar enfeksiyonlar, ilaç allerjileri, tümöral oluşumlar ve otoimmün hastalıklar dışından sağlıklı bireylerde de pozitif bulunabilir (47). Lupus antikoagülanlarının hipertansiyon, hemolitik anemi, çeşitli tümöral oluşumlar ve bazı ilaçlarla ilgisi olduğu gösterilmiştir. Lupus antikoagülanını indükleyen ilaçlar arasında hidralazin, klorpromazin, prokainamid yer alır. Bu ilaçlar lupus benzeri sendroma yal açarlar. Bunlarda APTT uzadığı bildirilmiştir. İlacın kesilmesiyle APTT düzelir (45).



Şekil - 9 : Kontrol grubu, APA (-) hasta grubu ve APA (+) hasta grubuna ait plazmalarda total Protein S ve serbest Protein S düzeylerinin dağılımı.

Bizim hastalarımız arasında bu ilaçlardan herhangi birisini kullanan yoktu. Enfeksiyon lehine bir bulgu gözlenmedi. HIV, CMV gibi mikroorganizmaların enfeksiyona neden olduğu hastalarda antikardiolipin antikor konsantrasyonlarının geçici olarak yüksek görülebileceği yazılmıştır (45).

Kardiolipin molekülüyle DNA çatısı arasındaki benzerlikler nedeniyle, bazı monoklonal antikorların kardiolipin 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. Sistemik lupus eritematosusda APA ve anti DNA antikorları benzer yabancı antijenlere cevap olarak ortaya çıkmış olabilir (34) (şekil 10).



Anti-n DNA lam aglutinasyon testi pozitif olan bir tek kadın hasta saptadık. İki yıl önce geçirilmiş felç hikayesi olan kadın, sekiz düşük yapmıştır. Intrakranial MR bulgusu olarak infarkt belirlenen kadının antifosfolipid antikor düzeyini 30 PL ünite/ml üzerinde bulduk. Total Protein S düzeyi %70, serbest Protein S düzeyi %36 olup, normal sınırlardaydı. Ancak, diğer hastaların ve kontrol grubu ortalamalarının altındaydı. Aile hikayesinde de annesinin epileptik hasta olduğu öğrenildi. Bu hastada bulunan anti-n DNA pozitifliği, çapraz reaksiyona bağlı olabileceği gibi otoimmün hastalığını da açıklar niteliktedir.



## SONUÇ

1) Kardiolipin, fosfotidilserin, fosfotidik asid fi bi anyonik fosfolipidlerin antijen olarak kullanıldığı kit ile Antifosfolipid Antikor (ELISA) çalışması yaptığımız 45 kadından oluşan hasta grubu ve 30 kadından oluşan kontrol grubu arasında Antifosfolipid Antikor pozitifliği açısından ileri derecede anlamlı bir fark bulundu.

Dünyada değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda tekrarlayan düşük ve ölü doğum hikayesi olan kadınlarda Antikordilipin Antikor prevalansı ile ilgili sonuçlar birbirini tutmamaktadır. Bizim bulduğumuz Antifosfolipid Antikor pozitifliğinin prevalansı, % 49 'dur. Bu sonuç, bazı araştırmacıların sonucu ile uyumludur. (Plazmanın elde edilmesi, depolanması, kullanılan reaktiflerin kaynağı ve teknikle ilgili farklılıklar testi etkilemektedir. Bu arada, RIA, ELISA metodlarına dayanan ticari kitlerin standardizasyon çalışmaları da devam etmektedir).

2) APA pozitif olan hastaların, APA negatif olan hastaların ve kontrol grubunun total Protein S, serbest Protein S düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

3) Hasta grubumuzda Antifosfolipid Antikor varlığı ile standart APTT testi uzamış (pozitif) olması arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu nedenle, tekrarlayan düşük yapan kadınlarda lupus antikoagülanının araştırılması amacıyla, sadece APTT testine başvurulmasının yanıltıcı olacağını düşünüyoruz. ELISA daha az spesifik antikor topluluğunu taradığı halde, günümüzde en kullanışlı tarama testidir.

4) APA pozitif bulduğumuz olgularda (APA ile VDRL arasındaki kros reaksiyona dayanan) yalancı pozitif VDRL lam aglutinasyonu testi sonucu, beklememize rağmen, hiçbir olguda rastlanmadı.

5) Anti-n DNA lam aglutinasyon testi sonucu, pozitif olan bir tek olguya rastladık. Ve bu hastanın hikayesi ve klinik bulguları otoimmün hastalığı olduğu lehinedir.



6) Trombofili öyküsü bulunan hastalarda aktif Protein C direnci, Protein C ve Protein S eksikliğine göre, daha sıklıkla rastlanılan bir durum olduğu bilindiğine göre, benzer bir çalışmayla Antifosfolipid Antikorların prevalansı ile birlikte aktif Protein C direnci olup olmadığı da araştırılabilir. Antifosfolipid Antikorların neden olduğu mekanizmalar karışıktır. Böyle bir çalışmanın sonuçlarının bu konuda bir katkısı olabilir.

7) Yeni modele göre, Antifosfolipid Antikorlar, Antifosfolipid Antikor sendromuyla ilgili  $\beta_2$  GPI 'e karşı antikorları hem de bu sendromla ilgisi olmayan kardiolipine karşı antikorları belirlemeye çalışır. Sadece  $\beta_2$  GPI 'e karşı antikorları belirleyecek bir çalışmanın Antifosfolipid Antikor sendromu için özgüllüğünün daha yüksek olacağı beklenmektedir. Patogenezin açıklanmasına yönelik çalışmalarda anti-Protein S ve diğer fosfolipide bağlanan proteinlere karşı gelişen antikorların saptanabilmesi yararlı olacaktır.

## ÖZET

Bu çalışma, 1995 yılında SSK-Göztepe Hastahanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği İnfertilite Polikliniğine başvuran 45 hasta üzerinde yapıldı.

Olgularda Antifosfolipid Antikor prevalansı % 49 bulundu. Antifosfolipid Antikor pozitif bulunan olgularda serbest Protein S düzeylerinde önemli bir değişiklik gözlenemedi.

Tekrarlayan düşüklerde koagülasyonla ilgili immünolojik bozuklukların varlığı bilinmektedir. Ve bu tür olgularda sistemik olarak immünolojik açıdan araştırma yapılması uygundur.

## KAYNAKLAR

- 1) Parke A.L., 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
- 2) Brown H.L. : Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss  
Clinical Obstetrics and Gynecology, 34 : 17, 1991
- 3) Erenus M. : Habitüel abortus ve nedenleri  
İstanbul Jinekoloji Derneğinin düzenlediği mezuniyet sonrası Eğitim kursunda anlattıkları, Kasım 1995.
- 4) Tunçay Y.A. : Habitüel abortus ve mükerrer İntrauterin ölüm olgularında lupus antikoagülanının yeri.  
Seri sekreterlik, İstanbul, 1990, 21
- 5) Gleicher N. : Autoantibodies and pregnancy loss  
The Lancet 343 : 747, 1994.
- 6) Schafer I. : Hypercoagulable states : molecular genetics to clinical practice.  
Lancet, 344 : 1739, 1994
- 7) Barinagarrementeria F. , et al : Prothrombotic States in young people whit idiopathic stroke.  
Stroke 25 (2) : 287, 1994
- 8) Stefano V.D. : et al : Thrombosis during pregnancy and surgery in patients with congenital deficiency of antithrombin III, Protein C, Protein S  
Thrombosis and haemostasis, 71 (6) : 799, 1994
- 9) Cook G., et al : Familial thrombophilia and activated Protein C resistance : thrombotic risk in pregnancy ?  
Britisch Journal of Haematology, 87 : 873, 1994
- 10) Cooper P.C., et al : Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency.  
Britisch Journal of Haematology 88 : 201, 1994.
- 11) Cooper D.N., et al : Molecular genetics of familial venous thrombosis.  
Britisch Medical Buletin 50 (4) : 833, 1994

## KAYNAKLAR

- 1) Parke A.L., 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
- 2) Brown H.L. : Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss  
Clinical Obstetrics and Gynecology, 34 : 17, 1991
- 3) Erenus M. : Habitüel abortus ve nedenleri  
İstanbul Jinekoloji Derneğinin düzenlediği mezuniyet sonrası Eğitim kursunda anlattıkları, Kasım 1995.
- 4) Tunçay Y.A. : Habitüel abortus ve mükerrer İntrauterin ölüm olgularında lupus antikoagülanının yeri.  
Seri sekreterlik, İstanbul, 1990, 21
- 5) Gleicher N. : Autoantibodies and pregnancy loss  
The Lancet 343 : 747, 1994.
- 6) Schafer I. : Hypercoagulable states : molecular genetics to dinical practice.  
Lancet, 344 : 1739, 1994
- 7) Barinagarrementeria F. , et al : Prothrombotic States in young people whit idiopathic stroke.  
Stroke 25 (2) : 287, 1994
- 8) Stefano V.D. : et al : Thrombosis during pregnancy and surgery in patients with congenital deficiency of antithrombin III, Protein C, Protein S  
Thrombosis and haemostasis, 71 (6) : 799, 1994
- 9) Cook G., et al : Familial thrombophilia and activated Protein C resistance : thrombotic risk in pregnancy ?  
Britisch Journal of Haematology, 87 : 873, 1994
- 10) Cooper P.C., et al : Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency.  
Britisch Journal of Haematology 88 : 201, 1994.
- 11) Cooper D.N., et al : Molecular genetics of familial venous thrombosis.  
Britisch Medical Buletin 50 (4) : 833, 1994

## KAYNAKLAR

- 1) Parke A.L., 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
- 2) Brown H.L. : Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss  
Clinical Obstetrics and Gynecology, 34 : 17, 1991
- 3) Erenus M. : Habitüel abortus ve nedenleri  
İstanbul Jinekoloji Derneğinin düzenlediği mezuniyet sonrası Eğitim kursunda anlattıkları, Kasım 1995.
- 4) Tunçay Y.A. : Habitüel abortus ve mükerrer İntrauterin ölüm olgularında lupus antikoagülanının yeri.  
Seri sekreterlik, İstanbul, 1990, 21
- 5) Gleicher N. : Autoantibodies and pregnancy loss  
The Lancet 343 : 747, 1994.
- 6) Schafer I. : Hypercoagulable states : molecular genetics to clinical practice.  
Lancet, 344 : 1739, 1994
- 7) Barinagarrementeria F. , et al : Prothrombotic States in young people with idiopathic stroke.  
Stroke 25 (2) : 287, 1994
- 8) Stefano V.D. : et al : Thrombosis during pregnancy and surgery in patients with congenital deficiency of antithrombin III, Protein C, Protein S  
Thrombosis and haemostasis, 71 (6) : 799, 1994
- 9) Cook G., et al : Familial thrombophilia and activated Protein C resistance : thrombotic risk in pregnancy ?  
British Journal of Haematology, 87 : 873, 1994
- 10) Cooper P.C., et al : Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency.  
British Journal of Haematology 88 : 201, 1994.
- 11) Cooper D.N., et al : Molecular genetics of familial venous thrombosis.  
British Medical Bulletin 50 (4) : 833, 1994

- 12) Clause L.H., et al : The protein C system  
The New England Journal of Medicine 314 (20) : 1298, 1986
- 13) Burtis L.A., Ashwood E.R. : Tietz Textbook of Clinical Chemistry  
W.B. Soundders Company, 2 nd Ed., Philadelphia, 1994, 737
- 14) Forestier F., et al : Vitamin K dependent proteins in fetal  
hemostasis at mid trimestre of pregnancy.  
Thrombosis and Haemostasis 53 (3) :401, 1985
- 15) Marlar R. : Protein C in thromboembolic disease  
Seminars in thrombosis and hemostasis II (4) : 387, 1985
- 16) Stryer L. : Biochemistry  
W.H. Freeman and Company, 3 rd Ed., New York, 1988, 179
- 17) Polack B., et al : Protein C level at birth  
Thrombosis and haemostasis, 52 (2) :188 ; 1984.
- 18) Faught W., et al : Changes in protein C and protein S in  
normal pregnancy.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology 172 :. 147,  
1995
- 19) Takahashi H., et al : Fast functional assay of protein C in whole  
plasma using a snakes venom activator : evaluation in patients  
with congenital and acquired protein C deficiencies.  
Clinica Chemica Acta, 175 : 217, 1988
- 20) Weiss P., et al : Decline of protein C and S and factors III, VII,  
IX and X during the initiation of warfarin therapy.  
Thrombosis Research 45 :. 783, 1987
- 21) Vasse M., et al : Protein C : Roues, A new hereditary protein C  
abnormality with low anticoagulant but normal amilolytic  
activities.  
Thrombosis Research 56 (3) : 387, 1989
- 22) Discipio R.G., et al : Characterization of protein S, a  $\gamma$  -  
carboxyglutamic acid containing protein from bovine and  
human plasma  
Biochemistry. ,18 : 899, 1979
- 23) Walker F. J. : Protein S and the regulation of activated  
protein C.  
Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 10 : 131, 1984



- 24) Bertina R.M. : Hereditary protein S deficiency.  
Haemostasis, 15 : 241, 1985
- 25) Meijer - Huizinga F., et al : Isolation and characterization of single-chain protein S.  
Thrombosis and Haemostasis, 72 (3) : 408, 1994
- 26) Griffin J .H., et al : Plasma Protein S deficiency and thromboembolic disease  
Progress in hematology, xv; 35,1987.
- 27) Dahlbäck B.; Interaction between vitamin K-dependent protein S and the complement protein, C4b-binding protein-A link between coagulation and the complement system  
Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 10 : 139, 1984.
- 28) Suzuki K. et al : Regulation of activated protein C by thrombin modified protein S.  
Journal of Biochemistry 94 : 699, 1983.
- 29) Gladson L.L., et al : The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis.  
Thrombosis and haemostasis, 59 (1) : 18, 1988.
- 30) Holmes C.H., et al : Complement and pregnancy.  
Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology. 6 (3) : 439, 1992.
- 31) 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 : 34, 1994.
- 32) Dahlbäck B. : Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S.  
Journal of Biochemistry, 209 : 847, 1983
- 33) Boerger L.M., et al : Oral contraceptives and gender effect protein S states.  
Blood, 69 (2) : 692, 1987.
- 34) Gouault-Heilmann M., et al : Inherited protein S deficiency.  
Thrombosis Research, 76 (3) : 269, 1994

- 12) Clause L.H., et al : The protein C system  
The New England Journal of Medicine 314 (20) : 1298, 1986
- 13) Burtis L.A., Ashwood E.R. : Tietz Textbook of Clinical Chemistry  
W.B. Saunders Company, 2 nd Ed., Philadelphia, 1994, 737
- 14) Forestier F., et al : Vitamin K dependent proteins in fetal  
hemostasis at mid trimestre of pregnancy.  
Thrombosis and Haemostasis 53 (3) :401, 1985
- 15) Marlar R. : Protein C in thromboembolic disease  
Seminars in thrombosis and hemostasis II (4) : 387, 1985
- 16) Stryer L. : Biochemistry  
W.H. Freeman and Company, 3 rd Ed., New York, 1988, 179
- 17) Polack B., et al : Protein C level at birth  
Thrombosis and haemostasis, 52 (2) :188 ; 1984.
- 18) Faught W., et al : Changes in protein C and protein S in  
normal pregnancy.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology 172 :. 147,  
1995
- 19) Takahashi H., et al : Fast functional assay of protein C in whole  
plasma using a snakes venom activator : evaluation in patients  
with congenital and acquired protein C deficiencies.  
Clinica Chemica Acta, 175 : 217, 1988
- 20) Weiss P., et al : Decline of protein C and S and factors III, VII,  
IX and X during the initiation of warfarin therapy.  
Thrombosis Research 45 :. 783, 1987
- 21) Vasse M., et al : Protein C : Roues, A new hereditary protein C  
abnormality with low anticoagulant but normal amilolytic  
activities.  
Thrombosis Research 56 (3) : 387, 1989
- 22) Discipio R.G., et al : Characterization of protein S, a  $\gamma$  -  
carboxyglutamic acid containing protein from bovine and  
human plasma  
Biochemistry. ,18 : 899, 1979
- 23) Walker F. J. : Protein S and the regulation of activated  
protein C.  
Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 10 : 131, 1984

- 35) Lane P.A., et al : Erythrocyte Membrane vesicles and irreversibly sickled cells bind Protein S.  
Amerikan Journal of Hematology, 47 : 295, 1994
- 36) Roubey R.A.S. : Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins : a new view of lupus anticoagulants and other antiphospholipid autoantibodies.  
Blood, 84 (9) : 2854, 1994.
- 37) Triplett D.A. : Coagulation assays for the lupus anticoagulant : Review and critique of current methology  
Stroke, 23 (2) : 11, 1992.
- 38) Robert A. : Two different incubation times for the activated partial thromboplastik time (APTT) : A criterion for diagnosis of lupus anticoagulant.  
Trombosis and Haemostasis 7 (2) : 220, 1994
- 39) Exner T., et al : Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants.  
Thrombosis and Haemostatis, 65 (3) : 320, 1991.
- 40) Murray R.K., et al : Harper's Biochemistry, Appleton and Lange, 23 th Ed. East Normalk, 1993, 244.
- 41) Gilman-Sachs A., et al : Patterns of anti-phospholipid antibody specificities.  
Journal of Clinical Laboratory and Immunology. 35 : 83, 1991.
- 42) Murray R.K., at et : Harper's Biochemistry, Appleton and Lange 23 thtd East Norwalk. 1993, 146.
- 43) Mackworth-Young C. : Antiphospholipid antibodies : more than just a disease marker ?  
Immunology today. 11 (2) : 60, 1990.
- 44) Feinberg B.B., et al : General precepts of the immunology of pregnancy  
Clinical Obstetrics and Gynecology 34 (1) : 3, 1991.
- 45) Rossi E., et al : Functional Protein S in woman with lupus anticoagulant inhibitor.  
Thrombosis Research, 65 : 253, 1993.

- 46) 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.
- 47) Parazzini F., et al : Antiphospholipid antibodies and current abortion  
*Obstetrics and Gynecology*, 7 (6) : 854, 1991.
- 48) Mac Lean M.A., et al : The prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in woman with a history of first trimestre miscarriages.  
*British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 101 : 103, 1994.
- 49) Patrassi G. M., et al : Fibrinolytic pattern in recurrent spontaneous abortions.  
*American Journal of Hematology*, 47 : 266, 1994.

T.C. VEKSE  
DOKUMAN

- EK - 1 -

### KULLANILAN İSTATİSTİK METODLAR :

1- Ortalama değerler arasındaki farkın önemlilik testi :  
(Student's t testi)

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{Sd} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2}}}$$

$n_1$  = Birinci grubun denek sayısı

$n_2$  = İkinci grubun denek sayısı

$\bar{X}_1$  = Birinci grubun ortalaması

$\bar{X}_2$  = İkinci grubun ortalaması

$SD_1$  = Birinci grubun standart sapması

$SD_2$  = İkinci grubun standart sapması

$SD_1^2$  = Birinci grubun varyansı

$SD_2^2$  = İkinci grubun varyansı

$Sd$  = İki ortalama arasındaki farkın standart hatası

2- Korelasyon :

$r$  : Korelasyon katsayısı

$x$  : Birinci grubun değerleri

$y$  : İkinci grubun değerleri

$n$  : Grubların denek sayısı

$$r = \frac{\sum xy - \frac{(\sum x) \cdot (\sum y)}{n}}{\left( \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left( \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}$$

## - EK - 2 -

### HASTA BİLGİ FORMU :

Hasta No :

Telefon No :

Adı ve Soyadı :

Doğum yılı :

Hastanın şu anda herhangi bir şikayeti var mı ? :

Ateş ( ) Halsizlik, yorgunluk ( ) İshal ( ) İdrarda yanma ( ) Öksürük ( )

### HASTANIN ÖZGEÇMİŞİ :

- Zaman zaman şu şikayetleri oldu mu ?

Görme bulanıklığı veya kaybı

Vücudun bir tarafında güçsüzlük veya uyuşukluk

Konuşma kusuru

Baş dönmesi

Yürüme bozukluğu

- Bu şikayetlerden herhangi birinin olduğu zaman oral kontraseptif kullanmakta mıydı ? Hamile miydi ?

Hamilelik sonrası döneminde miydi ?

- Çocukken geçirilmiş viral hastalıklar ve nasıl atlattığı ?

- Geçirmiş olduğu ameliyatlar ve ameliyat sonrası dönemler.

- Şu anda bildiği herhangi bir hastalık var mı ?

(DM, obezite, HT, Kalp-Damar hastalığı, varis, hemoroid gibi...)

- Kullandığı herhangi bir ilaç var mı ? Antikoagülan, oral kontraseptif ?

- Sigara alışkanlığı (miktarı) ?

- Alkol alışkanlığı (miktarı) ?

- Düşük hikayesi (kaç yıl arayla, kaç kere, kaç aylıkken kaybedildiği) Tedavi aldı mı ? Gebelik süresince ne gibi şikayetleri oldu ?

### AİLE ÖZGEÇMİŞİ :

Anne tarafında ölüm nedenleri ?

Baba tarafında ölüm nedenleri ?

Ailede tekrarlayan düşük hikayesi ?

Ailede tekrarlayan inme hikayesi ?

Ailesi aterosklerotik hastalık hikayesi ?

Ailede anevrizma hikayesi ?

Ailede kanamayla giden kan hastalığı hikayesi ?



## HASTANIN FİZİK MUAYENE BULGULARI :

### Genel durum :

- SLE düşündürebilecek deri bulguları : (olopesi, ağrısız oral ülserler, fotosensitivite)
- SLE düşündürebilecek eklem bulguları : (poliartralji, poliartrit)
- SLE düşündürebilecek hepatosplenomegali, sistemik adenopati :
- SLE düşündürebilecek nöropsikiyatrik bulguları (psikotik rxn, kasılma)
- SLE düşündürebilecek kalp-AC bulguları (plevrit, perikardit)

## HASTANIN LABORATUVAR BULGULARI :

- Rutin biyokimya analizi (serum ve idrar örneğinde)
- Sedimantasyon
- Hemogram
- PT, APTT
- anti-nDNA
- VDRL
- Antifosfolipid antikor
- Serbest Protein S, total Protein S

- EK - 3 -  
- Kontrol grubu -

Ad	TPS (%)	FPS (%)	APA	Yaş	APTT
SD	95	34	+	32	+
HA	100	41		29	
AB	90	40		39	
YK	72	30		37	
YU	94	40		34	
HÖ	110	48	+	26	
GY	85	38		34	
ZK	80	40		38	
RO	88	32		37	
VK	83	30		30	+
MK	90	35		36	
ŞÖ	100	40	+	32	
AO	100	40		40	
ii	95	38		35	
AT	100	38		34	
NA	75	46		35	
MT	75	40		34	
AY	87	38		30	
CG	82	36		36	
RÖ	93	43		35	+
NE	90	56		28	
NK	70	42		34	
NG	78	36		37	
NE	75	44		32	
ŞT	80	43		36	
HA	85	42		32	
FA	70	44		38	
ST	80	42		29	
ZA	96	32		35	
LG	94	36		34	

- Hasta grubu -

Ad	TPS (%)	FPS (%)	APA	Yaş	APTT	Düş.Say.	Kaç hft.d.
KA	132	65		35	+	5	12
AE	90	50	+	20	+	2	11
SB	100	44	+	30		2	22
SK	96	46		43		8	12
FÇ	70	36	++	40		8	16
AŞ	85	34		26		2	10
GG	75	34		32		4	10
SY	100	50	+	24		4	9
CY	110	40	+	37		7	8
DS	98	55		36		2	8
SY	105	46		32		2	12
NB	90	44	+	28		2	12
NT	95	50	+	27		2	12
GY	95	40		22		3	20
NÖ	95	46	+	20	+	2	16
ZB	75	40		27		3	8
HA	88	38		30		6	17
GK	84	40	+	32		2	15
NS	84	40		29		4	7
GK	85	36		27		2	16
AD	92	41		29	+	4	13
MT	92	38	+	32		3	10
TT	105	45		35	+	2	8
Kİ	85	38	+	31		3	12
HS	76	35	++	27	+	4	8
SY	99	45		32		2	12
AP	78	42		33		7	5
AE	68	30		21		2	10
HT	92	36		33		3	13
HT	95	42	+	25		3	8
FA	105	46		37		3	9
FE	100	48		33		3	10
SG	96	50		39		3	12
GT	106	45	+	22		2	6
BK	83	30	+	30		3	8
AÜ	83	28	+	29		7	16
SE	88	44	+	38		2	36
FY	104	46	+	46		5	12
HK	100	48		32		4	6
KK	80	29	+	19		2	12
SA	80	34		30		2	10
ED	95	52	+	33		2	7
EL	72	46		25		4	15
FY	95	48	+	31		2	12
NÇ	98	38	+	19		2	12

Dr. YÜKSEL  
DOKÜMAN