

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN DÜŞÜK ETİYOLOJİSİNDE
ANTİFOSFOLİPİD ANTİKOR SENDROMU
BELİRTEÇLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

“UZMANLIK TEZİ”

Dr. Vildan GÖRGÜLÜ

Danışman: Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

AFYONKARAHİSAR 2009

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Tekrarlayan Düşük Etiyolojisinde Antifosfolipid Antikor Sendromu Belirteçlerinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan : Dr.Vildan GÖRGÜLÜ

Tez Savunma Tarihi : 24.03.2009

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

İş bu çalışma jürimiz tarafından MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'ında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Doç.Dr.Orhan Cem AKTEPE

ÜYE

Doç.Dr. Zafer ÇETİNKAYA

ÜYE

Yrd.Doç.Dr.İhsan Hakkı ÇİFTÇİ

ONAY

DEKAN

Prof.Dr.Necat İMİRZALIOĞLU

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarım ve uzmanlık eđitimim sűresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandıđım deđerli tez danıŐmanım Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE hocama yardımları için teŐekkűr ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalıŐmalarım sűresince katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŐ, Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTCİ'ye teŐekkűr ederim.

Tezimi alıŐtıđım sűrece ve eđitimim boyunca birlikte çalıŐtıđım, yardımlarını gűrdűđűm asistan arkadaşlarıma ve tűm laboratuvar çalıŐanlarına teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
I-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II-GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. ANTİFOSFOLİPİD ANTİKOR SENDROMU.....	2
2.1.1. TARİHÇE.....	2
2.1.2. ETİYOLOJİ.....	3
2.1.3. SINIFLANDIRMA.....	3
2.1.4. PATOGENEZ.....	4
2.1.5. ANTİFOSFOLİPİD ANTİKORLAR.....	5
2.1.6. YALANCI POZİTİF VDRL.....	9
2.2. TEKRARLAYAN DÜŞÜK.....	10
2.2.1. TEKRARLAYAN DÜŞÜKLERDE ETİYOLOJİK FAKTÖRLER.....	11
2.2.1.1. Koagulasyon Sistemine ait Nedenler.....	11
2.2.1.2. İmmünolojik Nedenler.....	13
2.3. KLİNİK GÖRÜNÜM.....	19
2.4. TANI.....	21
2.5. TEDAVİ.....	23
III-GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. ELISA.....	26
3.2. ANTİKOR ÖLÇÜMLERİ.....	27
3.2.1. GEREKLİ MATERYALLER.....	28
3.1.2. KİTİN İÇERİĞİ.....	28
3.2.3. AYIRAÇLARIN HAZIRLANMASI.....	29
3.2.4. TEST PROSEDÜRÜ.....	29
3.2.5. TESTİN PRENSİBİ.....	31
3.2.6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	31
3.3. IFAT ANA.....	33
3.4. IFAT antiDNA.....	33

3.5. VDRL.....	34
IV-BULGULAR.....	35
V-TARTIŞMA.....	43
VI-SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
VII-ÖZET.....	56
VIII-SUMMARY.....	58
IX-KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR

AFAS	: Antifosfolipid antikor sendromu
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
VDRL	: Venereal disease research laboratory
ANA	: Antinükleer antikor
IFA	: Immunofluorescence assay
APA	: Antifosfolipid antikor
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
β 2-GPI	: Beta2-glikoprotein I
AKA	: Antikardiyolipin
PS	: Fosfotidilserin
PAPI	: Plasental antikoagulan protein I
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
TNF	: Tümör nekroz faktör
ASA	: Antisperm antikor
HCG	: Human corionic gonadotropin
aPTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
APC	: Aktive protein C
Th	: T helper
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
FasL	: Fas ligandı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
NK	: Naturel killer
Tregs	: Regülatuvar T hücreleri
APC	: Antijen sunan hücre
IDO	: İndolamin 2,3 dioksijenaz
ARDS	: Akut respiratuvar distres sendromu
İ.Ü.G.G.	: İnterüterin gelişme geriliği
DRVVT	: Dilue russel viper venom zamanı
KCT	: Kaolin pıhtılaşma zamanı
HCL	: Hidroklorik asit

PBS : Fosfat buffer solüsyon
FVL : Faktör V Leiden
HLA : Human lökosit antijen
PT : Protrombin zamanı
OPD : Ortofenilen diamino benzidin
TMB : Tetrametil benzidin
FITC : Fluorescein isothiocyante

TABLO LİSTESİ

Tablo-I	: Tekrarlayan düşüklerde olası etiyolojik faktörler.....	11
Tablo-II	: Gestasyonel trombofili nedenleri.....	13
Tablo-III	: AFAS kriterleri üzerine Uluslararası Görüş Birliği Bildirisi....	22
Tablo-IV	: Antifosfolipid antikor tipleri.....	27
Tablo-V	: Kitin içeriği.....	29
Tablo-VI	: Hastaların demografisi.....	36
Tablo-VII	: Antifosfolipid antikorlarının dağılımı.....	37
Tablo-VIII	: Fosfolipid ve fosfolipid bağlayıcı protein birlikteliği.....	37
Tablo-IX	: APA için seronegatif, seropozitif ve borderline hastalar.....	39
Tablo-X	: Antikardiyolipin antikorların analizi.....	40
Tablo-XI	: Antibeta2-glikoprotein I antikorların analizi.....	40
Tablo-XII	: Antifosfotidilserin antikorların analizi.....	41
Tablo-XIII	: Antiprotrombin antikorların analizi.....	41
Tablo-XIV	: Antiannexin antikorların analizi.....	42

GRAFİK LİSTESİ

Grafik-I	: Antifosfolipid antikorların dağılımı.....	37
----------	---	----

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-I : Koagulasyon mekanizması..... 9

I-GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan düşük, 500 gramın altındaki fetüsün, 20. haftaya ulaşmadan arka arkaya iki veya daha fazla sayıdaki kaybına denir. Gebeliklerin %15 kadarı düşük ile sonlanmakta ve bunların da %0.5-1'inde tekrarlayan gebelik kaybı görülmektedir (1).

Düşük etiolojisinde immünolojik nedenler önemli bir yer kaplamaktadır. İmmünoloji alanında yapılan araştırmalar, nedeni izah edilemeyen düşüklerin %20-50'sinin bağışıklık sistemi bozukluklarına bağlı olabileceğini göstermektedir (2).

Antifosfolipid antikor sendromu (AFAS), tekrarlayan düşüklerin immünolojik sebeplerinden biridir. Tekrarlayan düşükler fosfolipidlere karşı IgG, IgM, IgA tipi antikorların gelişmesine yol açmakta ve bu antikorlar da hücre fonksiyonlarını bozmakta, sonuçta da enflamasyon ve pıhtılaşmaya neden olmaktadır. Bir çalışmada tekrarlayan düşüklerin %10-50'sinde antifosfolipid antikorları tespit edilmiştir (3). Bu antikorların miktarı her gebelik kaybı ile %15 artmaktadır.

Bu çalışmada, tekrarlayan düşük etiyojileri arasında önemli bir yeri bulunan antifosfolipid antikor sendromuna ait belirteçlerin saptanması ve buna bağlı bozuklukların tedavisine yol gösterilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, Afyon bölgesinde tekrarlayan düşük geçiren gebelerde; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile antikardiyolipin antikor (AKA) IgG-IgM-IgA, antibeta2-glikoprotein I (anti β 2-GPI) IgG-IgM-IgA, antifosfolipidlerin (anti-PS) IgG-IgM, antiprotrombin IgG-IgM-IgA ve antiannexin V IgG-IgM antikorları araştırılmıştır. Ayrıca bu antikorlarla birlikte Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) sifiliz testi, antinükleer antikor (ANA) ve antiDNA parametreleri de Immunofluorescence assay (IFA) yöntemiyle değerlendirilmiştir.

II-GENEL BİLGİLER

II.1. ANTİFOSFOLİPİD ANTİKOR SENDROMU

Fosfolipidlere karşı antikor üretimi ile ortaya çıkan, arteryel ve venöz trombozlar ile seyreden klinik tabloya antifosfolipid antikor sendromu (AFAS) denir (4,5). Normal populasyonun %2-4'ünde AFAS görülmektedir. Bu sendrom ile ilişkili başlıca antikorlar şunlardır:

- 1) Antikardiyolipin antikor
- 2) Antibeta-2glikoprotein I antikor
- 3) Antifosfotidilserin antikor
- 4) Antiprotrombin antikor
- 5) AntiannexinV antikor
- 6) Antifosfotidil inositol antikor
- 7) Antifosfatidik asit antikor
- 8) Antifosfotidil etanolamin antikor
- 9) Antinükleer antikor
- 10) AntiDNA
- 11) VDRL

Antifosfolipid antikor sendromu, sistemik otoimmün bir patolojidir. Genellikle arteryel-venöz trombozlar, fetal kayıplar ve otoimmün trombositopeni ile seyretmektedir (6,7). Antifosfolipid antikor (APA)'lar, anyonik (negatif yüklü) fosfolipidlere (kardiyolipin, serin, fosfatidik asit, inositol, gliserol), fosfolipidlere bağlanan plazma proteinlerine (beta2-glikoprotein I, protrombin ve annexin V) veya her ikisine karşı oluşabilir. Bazı durumlarda antikorlar, bilinmeyen bir nedenden dolayı, bireyin kendi proteinlerini de yabancı olarak algılayıp reaksiyon gösterirler. Vücudun kendi yapıtaşlarına karşı oluşan bu durumlar otoimmün hastalıklar kapsamında değerlendirilir. Dolayısıyla AFAS da bir otoimmün fenomendir.

II.1.1. Tarihçe:

Kan testi incelemelerinde sifiliz pozitifliği bulunan kişilerde 1906 yılında sığır kalbi ekstraktı ile reaksiyona giren bir takım antikolar dikkati çekmiştir. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalığı bulunan kişilerde 1952 yılında pıhtılaşma bozukluklarının artmış olduğu gözlenmiştir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında 1957 yılında kanda bir madde saptanmış ve düşüklerle bu madde arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotez 1983 yılında Dr. Graham Hughes tarafından doğrulanmıştır. Dr. Graham Hughes, antijen olarak kardiyolipin maddesini kullanarak SLE'li hasta serumunda antikardiyolipin antikolarını göstermiştir (8). Aynı araştırmacılar 1987 yılında antifosfolipid antikolar ile pıhtılaşma bozuklukları arasındaki ilişkiyi saptayarak AFAS'ı tanımlamışlardır. Sonraki yıllarda ise bazı antikardiyolipin antikoların, kardiyolipini bağlamak için serumda bulunan beta2-glikoprotein I (β 2-GPI) gibi fosfolipid bağlayıcı proteinlere gereksinim duyduğu saptanmıştır. Beta2-glikoprotein I, SLE ve antifosfolipid sendromunun etiyopatogenezinde yer alır. Ancak sifiliz ve diğer enfeksiyon hastalıklarında saptanmaz.

II.1.2. Etiyoloji:

Antifosfolipid antikor sendromu, genetik nedenlerin de rol aldığı immün sistem kökenli vasküler bir hastalık grubudur. Plasenta, bir damar kompleksinden oluştuğu için, bu patolojik durumdan etkilenmektedir (9). Antifosfolipid antikor sendromu'nun etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bilindiği gibi trombozun etiyolojik faktörleri arasında oral kontraseptif, diyetdeki lipidler ve sigara kullanımı bulunmaktadır. Ancak bu faktörlerin antifosfolipid antikor oluşması ile ilgili olup olmadığı bilinmemektedir. Yapılan araştırmalarda HLA-DR7, HLA-DR4 ve HLA-DQW7+HLA-DRW53 alloantijenleri ve antifosfolipid antikolar arasında bir ilişki görülmüş ve bu paterne sahip olan ailelerde antifosfolipid antikoları pozitif bulunduğu saptanmıştır (10).

II.1.3. Sınıflandırma:

Sınıflandırma, etiyolojik nedenlere göre yapılmaktadır. Antifosfolipid antikor sendromu, primer veya diğer hastalıklara sekonder gelişebilir. Sıklıkla

birlikte olduğu hastalıklar otoimmün ve romatizmal hastalıklar (SLE, Romatoid Artrit, Skleroderma, Sjögren hastalığı, Behçet sendromu, Hemolitik anemi, İdiopatik Trombositopenik Purpura, Polimiyozit, Dermatomyozit v.b.), enfeksiyonlar (Hepatit A, Hepatit C, sifiliz, malarya, ARDS, kabakulak, Human T Lymphotropic Virus, Enfeksiyöz Mononükleoz v.b.), ilaç kullanımı (kinin, kinidin, propranolol, amoksisilin, alfa interferon, prokainamid, fenitoin v.b.) sayılabilir.

II.1.4. Patogenez:

Normalde hücre üzerinde antifosfolipid antikorlarına bağlanan fosfolipidlerin ekspresyonu bulunmamaktadır. İskemi, travma, apoptozis, enfeksiyon, enflamasyon ve ilaç kullanımı ile hücrelerde fosfolipidler eksprese edilmeye başlar. Eksprese edilen fosfolipidlerin oksidasyonu ile ortaya çıkan yıkım ürünleri farklı proteinler ile kombinasyon oluştururlar ve ortaya yeni epitoplara çıkar. Bu yeni epitoplara karşı da antifosfolipid antikorlar oluşabilir. Dolayısıyla antioksidan ilaçlardan E ve C vitaminlerinin tromboz eğilimini azaltabileceği yönünde değerlendirmeler yapılmıştır. Yapılan araştırmalar, APA'ların, oksidasyon mekanizması ile damar endotelinde hasara yol açabileceğini göstermektedir (11).

Antifosfolipid antikor'ların bağlandığı antijenler kısmen anlaşılabilmiştir. Bu antikorlar; fosfolipidler ile kompleks oluşturmuş plazma proteinlerine (β 2-GPI, protrombin, annexin V, protein C, protein S v.b.) daha çok bağlanmakta, anyonik fosfolipidlerin kendisine (kardiyolipin, fosfatidilserin v.b.) ise daha az bağlanmaktadır. Bu nedenden dolayı, AFAS'da tromboza eğilimde β 2-GPI, protrombin, annexin V, protein C, protein S gibi çok farklı koagülasyon proteinleri rol almaktadır. Antifosfolipid antikor sendromu'nda trofoblast hücrelerinin anormal migrasyonu ve sonuçta yetersiz yüzeyel implantasyon durumu söz konusudur. Plasenta incelenecek olursa, enfarkt alanları, perfüzyonu bozulmuş alanlar, nekroze bölümler ve yaygın trombozis görülebilmektedir. Genellikle spiral arter vaskülopatisine rastlanmaktadır. Spiral arterler ile trofoblast hücreleri arasında ilişki bozulmaktadır. Antifosfolipid antikor sendromu'nda

gebelik kaybında altta yatan mekanizma; plasental vasküler tromboz ile oluşan anormal plasenta fonksiyonudur. Antifosfolipid antikor sendromu'nda kompleman sisteminin de rol oynadığı bildirilmektedir. Yapılan araştırmalarda, kobaylarda C3 aktivasyonunun gebelik kaybında rol aldığı gözlenmiştir (12).

II.1.5. Antifosfolipid Antikorlar:

Fosfolipidlerle reaksiyon veren APA'lar, heterojen bir grup oluştururlar. Antifosfolipid antikor'lar normal bireylerde de bulunabilir. Normal populasyonda %5 oranında rastlanmaktadır. Yaşlılarda yaklaşık %32 oranında pozitiflik saptanmıştır. Tekrarlayan fetal kayıpların %10-50'sinde bu otoantikorlar pozitif olarak bulunur (2). Antifosfolipid antikor'lar genellikle IgG veya IgM grubuna aittir. Kardiyolipin, fosfotidilserin, fosfotidilinositol anyonik, fosfotidil etanolamin ise nötral fosfolipidlerdendir. Bazı APA'lar, anyonik fosfolipidlere direk olarak bağlanamaz. Bağlantı için bir takım kofaktörler gereklidir. Günümüzde gerek kofaktör, gerekse primer antijenik hedef olarak birçok antijen tanımlanmıştır. Kofaktörler arasında en önemlisi β 2-GPI molekülüdür. Roubey ve ark. 1994 yılında, antikardiyolipin antikorlarının bir kısmının, eğer ortamda seruma ait faktörler yoksa kardiyolipine bağlanmadığını, serumun ilavesi ile bağlanmanın gerçekleştiğini ve bunun da serumdaki β 2-GPI sayesinde gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (13). Fosfolipidler ile reaksiyona giren antikorlar genelde geçicidir ve iyileşme döneminde kaybolurlar (14).

1) Antikardiyolipin antikorlar (AKA): Kardiyolipin anyonik bir fosfolipiddir. Kardiyolipine karşı oluşmuş otoantikorlar primer ve sekonder AFAS saptanan hastalarda görülmektedir. Antikorlar IgG, IgM, IgA sınıflarında ve IgG₁₋₄ subgruplarını içermektedir. Özellikle IgG₂ tipi antikorlarda tromboz riski yüksektir. İlk kez Londra'daki St Thomas Hastanesi'nden Haris ve ark. 1983 yılında duyarlı bir test olarak AKA'ları bulduklarını bildirmişlerdir (15). Antikardiyolipin antikor IgG, IgM, IgA antikorlarının hepsi trombozla ilişkilidir. Ancak izole IgA AKA sonuçlarının klinik önemi tartışmalıdır. AKA'lar, fosfolipidlere direk bağlanmaz, genellikle β 2-GPI hedefiyle beraberdir (16). Antifosfolipid antikor sendromu ile ilişkili olan AKA'nın, β 2-GPI'in negatif

yüklü fosfolipidlere bağlanması sonrasında açığa çıkmakta olan gizli epitoplara tanıdığı bildirilmiştir (17). Beta2-glikoprotein I bağımsız AKA'lar, sıklıkla enfeksiyon sonucu gelişir (Sifiliz ve Lyme hastalığı). Beta2-glikoprotein I bağlı AKA'lar ise otoimmün karakterlidir.

2) Beta2-glikoprotein I'e karşı oluşmuş antikorlar (anti β 2-GPI):

Antifosfolipid antikor sendromu'ndaki ana otoantijenlerden biri β 2-GPI'dir ve antifosfolipid antikorlarının ana patojenik alt kümesi için hedef bağlanma molekülüdür (18,19). Serumdaki β 2-GPI, sadece APA'ların tespiti için önemli bir kofaktör değildir. Aynı zamanda bağımsız bir otoantijenik hedef olarak bağımsız bir şekilde bulunmaktadır. Genelde diğer APA'lar ile beraber saptanmasına rağmen, yaklaşık olguların %11'inde tek başına pozitif saptanır. Antifosfolipid antikor ile β 2-GPI kompleksleri trofoblastların proliferasyonunu ve maternal spiral arter invazyonunu inhibe etmektedir. Sonuçta plasentada geniş nekroz, enfarkt ve trombozlar oluşmaktadır.

Beta2-glikoprotein I, negatif yüklü fosfolipidleri bağlamaktadır. Özellikle fosfatidilserin başta olmak üzere fosfolipidlere bağlı olarak bulunmaktadır. Pıhtılaşmada kontakt aktivasyonu inhibe etmektedir. Bu nedenle β 2-GPI, koagülasyon ve trombosit agregasyonunda doğal inhibitör olarak bilinir. Ayrıca protrombin aktivasyonunu da inhibe etmektedir (Şekil I). Dolayısıyla β 2-GPI doğal antikoagulan olarak tanımlanmaktadır ve bu faktörün APA ile inhibe edilmesi ile trombozlar gelişmektedir. Ayrıca β 2-GPI, serbest protein S'in plazmada yeterli düzeyde olmasına katkıda bulunmaktadır. Ancak oluşan antikorlar ile β 2-GPI azalmakta, dolayısıyla protein S düzeyi de azalmakta ve tromboza eğilim artmaktadır. Gali ve ark., tromboz eğiliminde anti β 2-GPI'in AKA'dan daha iyi belirleyici olduğunu bildirmişlerdir (20). Antifosfolipid antikor ile ilgili en son yapılan klavuzlarda anti β 2-GPI'in tanı kriterleri içine alınabileceği bildirilmiştir (21). Beta2-glikoprotein I'in bir antikoagulan olarak kabul edilmesini sağlayan durumlar; protrombinaz aktivitesinin inhibisyonu, ADP aracılıklı trombosit agregasyonunun inhibisyonu, faktör X ve protrombin aktivasyonunun inhibisyonu, gelişmiş protein S antikoagulan işlevi gibi çeşitli

invitro özellikler göstermektedir (22). Shi ve ark., β 2-GPI'in faktor XI'e bağlanabileceğini tespit etmişlerdir (23,24). İnvitro çalışmalarda protrombinaz aktivitesini inhibe ettiği, koagülasyon sistemiyle ilişkili olduğu ve trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (25). Beta2-glikoprotein I antijeninin 5 domaini bulunmaktadır. Trombotik olaylar domain 1'e karşı antikor varlığı ile ilişkilendirilmiştir (26).

3) Antifosfatidilserin antikorlar (Anti-PS): Fosfatidilserin, negatif yüklü bir fosfolipiddir. Bu molekül hücre membranının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Gharavi ve ark. 1987 yılında, AFAS'lı hastalarda fosfatidilserin karşıtı olan otoantikorlar keşfetmişlerdir. Sıklıkla tek başlarına bulunurlar. Antifosfatidilserin (Anti-PS) ve gebelikteki komplikasyonlar arasında bir ilişkinin varlığı, AFAS'lı ya da geçmişlerinde gebelik kayıpları bulunan kadınlarda belgelenmiş durumdadır (27). Antifosfatidilserin antikorlarının gebelik kaybındaki rolü ise invitro ve invivo çalışmalarla gösterilmiştir. Antifosfatidilserin antikorlarının normal farelere transferi, deneysel AFAS ile sonlanmıştır. Bunlarda, fekdüte oranı, gebelik başına embriyo sayısı ve embriyolar ile plasentaların ağırlıklarındaki düşüklük, daha yüksek oranda fetal rezorpsiyon oranı tespit edilmiştir. İlk trimester süresince sıçan embriyolarının anti-PS monoklonal antikorları ile karşı karşıya kalışı, yolk kesesinde apoptotik süreçlere eğilimde artışla sonlanmıştır (28).

4) Antiprotrombin antikorlar: Protrombin (pıhtılaşmanın faktör II'si), K vitaminine bağımlı bir plazma proteini olup iki adet domain ile bir serin proteaz bölgesi içeren glikoproteindir (29). Protrombin, fibrinojenin fibrine çevrilmesini tetikleyen bir fosfolipid proteindir. Protrombin, faktör Va, Xa, fosfolipidler ve kalsiyum iyonlarından oluşan bir protrombinaz kompleksi tarafından aktive edilir ve in vivo ortamda α -trombin'e ayrılır (Şekil I). Antiprotrombin antikorları AFAS'lı hastalarda tromboz ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Protrombin antikorlar aktive olmuş hücrenin yüzeyinde protrombin kümelenmesine sebep olurlar. Son birkaç yıldır antiprotrombin antikorları ve bu antikorların trombozdaki rolleri üzerinde giderek artan bir dikkat oluşmuştur (30). Antiprotrombin antikorları,

protrombinden trombine dönüşmeyi inhibe ederek invitro pıhtılaşma testlerinin süresinde uzama gösterirler (31). Antifosfolipid antikor'ların tek başına fosfolipidlere yönelik olmayıp fosfolipid kompleksleri ve β 2-GPI ile protrombin gibi fosfolipid bağlayan proteinlere yönelik olduğuna dair genel bir fikir birliği söz konusudur. Yakın dönemde ise β 2-GPI gibi protrombin'in de ana fosfolipid bağlayıcı proteinlerden olduğu netleşmiştir (32).

Hipoteze göre antiprotrombin, protrombin moleküllerini çapraz bağlantılayabilir ve bu sayede protrombin ile fosfatidilserin (PS) arasındaki etkileşimlerin değerliklerini artırabilir. Bu ise antiprotrombin'in protrombinin endotel hücreesindeki PS'ye bağlanmasını geliştirebileceği ve bu sayede trombin üretimini artırarak trombozu artırabileceği anlamına gelmektedir (33). İlâveten PS ile muhtemel bağlanmaları açıklayabilecek şekilde antiprotrombin antikorların, β 2-GPI ile epitop paylaşmakta olduğu gösterilmiştir (16). β 2-GPI ile epitop paylaşımı nedeniyle antiprotrombinin, anti β 2-GPI gibi davranabileceği düşünülmektedir.

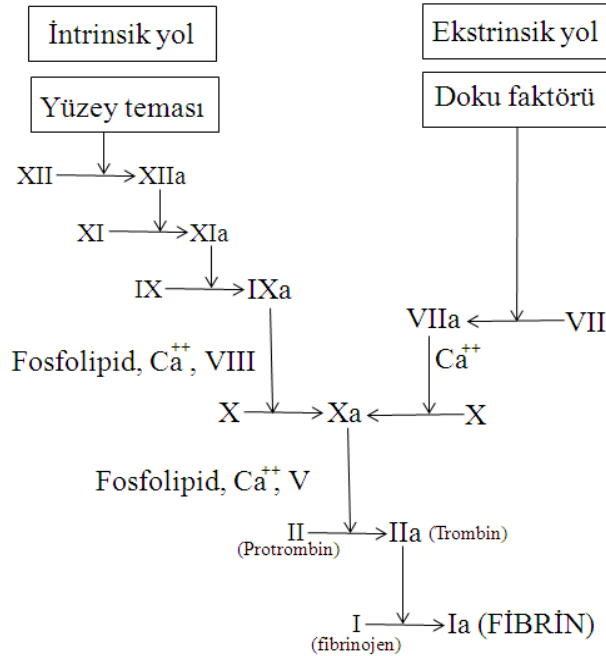
Bu süreçte endotel hücreleri için çeşitli etkileşimler ileri sürülmektedir:

1) Antiprotrombin antikorları, endotelial hücre yüzeyinde protrombin-anyonik fosfolipid kompleksini tanıyabilmekte, bu yüzden endotelial hücreleri aktive ederek protrombin üzerinden prokoagulan maddelerin üretimini sağlamaktadır.

2) Antiprotrombin antikorları, protrombin'in negatif yüklü fosfolipidlere olan afinitesini artırabilmektedir (34).

5) Antiannexin V antikorlar: Plasental antikoagulan protein I (PAPI) olarak da bilinmekte olan annexin V, sadece, kalsiyuma bağlı bir şekilde fosfolipidlere bağlanan proteinler ailesine ait olmakla kalmayıp aynı zamanda kuvvetli bir vasküler antikoagulan protein yapısındadır. Annexin V, plasental sınıctyotrofoblastların apikal yüzeyinde bulunur ve AFAS hastalarında plasenta villuslarında önemli ölçüde azalmış olarak bulunur (35). Yapılan araştırmalarda, annexin V'in yüzeydeki fosfolipidler üzerinde kümeler oluşturduğu ve bunun da

fosfolipid yüzey için bir koruyucu kalkan teşkil ettiği bulunmuştur. Annexin V aslında trombozu baskılayıp intervillöz dolaşımın akışkanlığını sağlayacak şekilde konumlanmıştır (36). Tekrarlayan düşük vakalarının, annexin V'e karşı oluşmuş antikolar ile oluşabileceği veya trofoblastlardan hormon (gonodotropin) salınımının azalmasıyla meydana gelebileceği söylenmektedir (37). Antiannexin V antikoları, AFAS'da ve tekrarlayan fetal kayıplarda yüksek oranda spesifik risk etkenleri olarak tanımlanmışlardır (38). Antifosfolipid antikor sendrom'lu gebe kadınların serumlarında tespit edilmiş olan yüksek antiannexin V seviyeleri, gebelik kayıpları ile ilişkili bulunmuştur (39). Benzer şekilde, APA'ları bulunan ve trombojenik zeminde tekrarlayan gebelik kayıpları görülen kadınlardaki plasental villuslarda annexin V eksikliği gözlemlenmiştir (40). Buna paralel olarak, antiannexin V'in endotel hücrelerinde apoptoza yol açarak trombotik sürecin doğrudan indüksiyonunda görev aldığı bulunmuştur (41). Ayrıca, annexin V, fosfatidilserin'e de bağlanabilmekte ve koagülasyon önlenmektedir. Annexin V ve fosfatidilserin kompleksine karşı oluşmuş APA'lar ise oluşan bu anti-protrombotik durumun inhibisyonuna neden olmaktadır.



Şekil I. Koagülasyon mekanizması.

II.1.6. Yalancı pozitif VDRL:

Veneral Disease Research Laboratory (VDRL) sifiliz testi'nde kullanılan sifiliz antijeni kardiyolipin yapısındadır (kardiyolipin-lesitin-kolesterol karışımı). Antijenler, normal dokunun alkol ile ekstraksiyonundan elde edilmiştir. Antikardiyolipin varlığında VDRL pozitif saptanmaktadır. Antifosfolipid antikor sendrom'lu hastalarda sifiliz testlerinin yalancı pozitifliği saptanır. Antifosfolipid antikor sendrom'da yalancı pozitif VDRL'nin temeli, bu testte antijen olarak kullanılan karışımın fosfolipid içermesidir.

Veneral Disease Research Laboratory sifiliz testi presipitasyon temeline dayanır. Fosfolipid antijen partikülleri normal serumla karşılaştırıldığında homojen süspansiyon halinde kalmakta, ancak aynı antijenler sifilitik veya AFAS'lı hasta serumundaki reaginler ile birleştiğinde kümeler oluşturmaktadır. Bu testin sensitivite ve spesivitesi çok düşüktür. Antifosfolipid antikor sendrom'lu kadınların yaklaşık %40'ında sifiliz için yalancı pozitiflik durumu söz konusudur.

II.2. TEKRARLAYAN DÜŞÜK

Düşük, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1977 yılında, ağırlığı 500 gramdan daha az fetüs ve eklerinin uterus kavitesi dışına atılması olarak tanımlanmıştır (42). Tekrarlayan düşük ise, gebeliğin, arka arkaya 2 ya da daha fazla sayıda, 20. gebelik haftasından önce sonlanmasıdır.

Gebeliğin 12. haftasından önce oluşan kayıplara erken düşük, 12. haftadan sonraki kayıplara ise geç düşük denir. Düşüklerin %80'den fazlası ilk 12 hafta içinde olmaktadır (43). Bu oran 12. haftadan sonra hızla düşmektedir.

Yapılan araştırmalar düşük oranlarının obstetrik öykü ile değiştiğini göstermiştir (44). İlk gebeliği elektif olarak sonlanmış ise sonradan düşük riski nisbeten düşüktür (%4-6). Eğer önceki gebeliği spontan düşük ile sonlanmış ise gelecek gebeliklerdeki düşük riski (%19-24) artmaktadır. İki düşükten sonra risk %24, üç düşükten sonra %30, dört düşükten sonra %40-50'lere ulaşmaktadır (45).

Üç ardışık düşükten sonra canlı doğum şansı %55-60'tır, ancak tekrarlayan düşüklere ek olarak canlı bir doğum da mevcut ise bu şans %70'lere ulaşmaktadır.

II.2.1.TEKRARLAYAN DÜŞÜKLERDE ETİYOLOJİK FAKTÖRLER

Tekrarlayan düşük her yıl 500.000'den fazla kadını etkilemektedir. Tekrarlayan düşüklere çeşitli olası etiyolojik faktörler vardır (Tablo I) (2). Ancak olguların çoğunda etiyolojik faktör gösterilememiştir (46).

Tablo I. Tekrarlayan düşüklere olası etiyolojik faktörler.

Etyoloji	İnsidans (%)
Genetik nedenler	3.5-5
Anatomik nedenler	12-16
Endokrinolojik nedenler	17-20
Enfeksiyöz nedenler	0.5-5
Koagülasyon sistemine ait patolojiler	5-15
Çevresel ve diğer nedenler	10
İmmünolojik nedenler	20-50

Yapılan araştırmalarda tekrarlayan düşük ile enfeksiyon ajanı arasında ilişkiler gösterilmiştir (47). Yine de mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Araştırmacılar, bazı virüs ve bakterilerin fetüs ve plasentayı enfekte ederek doku zedelenmesine ve düşüğe neden olabileceğini düşünmektedirler. Tekrarlayan düşük ile ilişkili olabileceği ancak doğruluğu kanıtlanmamış mikroorganizmalar; B grubu streptokok, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma hominis*, *Herpes Simplex virüs*, *Cytomegalovirüs*, Malarya, Rubella (kızamıkçık), *Parvovirüs B19*, *Varisella Zoster virus* (suçiçeği)'dir. Diğer bir görüş ise, fetüsün otoimmün olarak reddini önleyen bir mekanizmanın olduğu, ancak plasentanın enfekte olması ile tanınmasının önlenmediği ve böylece düşüğün gelişebileceğidir.

II.2.1.1. Koagülasyon Sistemine ait Nedenler

Koagülasyon sistemine ait nedenler, tekrarlayan düşüklere %5-15'ini oluşturmaktadır. Hemostatik sistem, birbiri ile etkileşen üç bölümden meydana gelmektedir. Bunlar, trombositler, damar endoteli ve pıhtılaşma faktörleridir.

Hemostatik mekanizma bozulacak olursa kanın pıhtılaşması sonucu implantasyonun gerçekleşmemesi, plasentanın erken ayrılması ve fetüsün gelişiminin bozulması gibi olaylar oluşur. Bunun sonucunda ise düşük gelişir. Yapılan araştırmalarda, trombofilik bozuklukların tromboz oluşumuna neden olarak tekrarlayan düşüklere neden olduğu gösterilmiştir (48). Bu grupta önemli olan parametreler, aktive protein C rezistansı, protrombin mutasyonu, hiperhomosisteinemi, protein S, protein C ve antitrombin III eksiklikleri sayılabilir (49). Doğal antikoagulan olan heparin, antitrombin III sistemi, protein C, protein S sistemi koagülasyon reaksiyonlarını kontrol altına alan plazma proteinleridir. Gebelikte antitrombin III düzeyinde azalma gözlenir. Protein C çok hafif artarken, protein S çok azalır. Plazmaya protein C'nin eklenmesi ile antikoagülasyon olmakta ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) artmaktadır. Ancak aktive protein C rezistansı mevcut ise trombofilik riski oluşmaktadır. Protein C, Faktör Va ve Faktör VIIa'yı inhibe ederek pıhtılaşmayı önler. Ancak Faktör V genindeki bir mutasyon ile aktive protein C, Faktör V'i inaktive edememektedir. Mutasyona uğramış Faktör V'e 'Faktör V Leiden' denmektedir. Kalıtsal trombozların en sık sebebi olan APC (aktive protein C) rezistansının %95'inde sebep bir nokta mutasyonu olmaktadır (Faktör V Leiden-FVL). Sağlıklı populasyonda bu mutasyon %3-12 oranında görülmektedir. Gebelik sırasındaki bu değişiklikler trombusa yatkınlığı arttırmaktadır. Gebelik sırasında artan fibrin yıkım ürünleri de fibrin oluşumundaki artışı göstermektedir.

Tromboz eğilimine yol açan hemostatik değişikliklere trombofilik denmektedir. Trombotik bozukluklar kalıtsal veya edinsel (kazanılmış) olabilir (Tablo II). Gebelikte en sık görülen kazanılmış trombofilik nedeni AFAS'dır (50). Kalıtsal trombozun en sık nedeni ise APC rezistansıdır. Gebelikte tromboemboli geçiren olguların %46-60'ında APC rezistansı bildirilmektedir (51).

Tablo II. Gestasyonel trombofili nedenleri.

<u>Kalıtısal</u>
Antitrombin III eksikliği APC rezistansı (Faktör V Leiden mutasyonu) Protein C eksikliği Protein S eksikliği Protrombin gen mutasyonu Hiperhomosisteinemi Trombomodulin gen mutasyonu
<u>Kazanılmış (akkiz)</u>
Antifosfolipid sendromu Endokrin bozukluklar Hematolojik bozukluklar Otoimmün hastalıklar Diğer

II.2.1.2. İmmünolojik Nedenler

Yapılan araştırmalar, tekrarlayan düşüklerin %20-50'sinin immünolojik nedeni olabileceğini göstermektedir (2). İmplantasyon, fetüsteki yabancı hücrelerin maternal dokulara invazyonu ile gerçekleştiği için fetüs immünojeniktir. Fetal antijenlere karşı oluşmuş bir bağışıklık cevabı mevcuttur.

T lenfositler, dolaşımdaki lenfositlerin %60-80'ini oluşturmaktadır. Periferik kandaki T hücrelerinin 2/3'ü CD4⁺, 1/3'ü CD8⁺ yüzey reseptörleri taşırlar. CD8⁺ reseptörü taşıyan grup, sitotoksik fonksiyon yapan efektör T hücrelerinden oluşur. CD4⁺ T lenfositleri, T helper (Th) hücreleri olarak da isimlendirilir ve Th₁ ve Th₂ olarak iki alt grubu mevcuttur (52).

Sitokinler, immün yanıt oluşumunda, immün sistem hücrelerinin karşılıklı ilişkilerini düzenleyen glikoprotein yapısında maddelerdir. Th₁ hücreleri interferon-gamma (IFN- γ), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), tümör nekroz faktör-beta (TNF- β) ve interlökin-2 (IL-2) sitokinlerini salgırlar. Th₂ hücreleri ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerini üretir. Gebelikte, IL-2 oluşturan Th₁ sitokin profili gebelik boyunca baskılanır, böylece profil Th₂ yönüne kaymaktadır.

Bu durum, T hücrelerinin gen ekspresyonunda oluşan progesteron aracılı değişiklikler ile Th₂ hücre cevabına kaymasından kaynaklanabilir. Desidual Th₁ hücrelerinin azalması, Fas-FasL (Fas ligantı) aracılığı ile oluşan apoptoz nedeniyle gelişmiş olabilir. Fas antijeni bir yüzey reseptörü olup Tümör nekrozis faktör (TNF) gen ailesinin ürünlerindedir. Bu ailenin üyeleri arasında Fas, FasL ve TNF- α bulunmaktadır. Bu gen ailesinin ortak özelliği 'death domain' (öldürücü zehir) taşımalarıdır. Fas-FasL ilişkisi, T hücrelerinin klonal delesyonunda çok önemli rol oynamaktadır. Antijen prezente eden hücrelerce bir otoantijenin insan lökosit antijeni (HLA) ile beraber sunulması halinde otoreaktif özellik taşıyan T hücrelerinde Fas ve/veya FasL ekspresyonu ortaya çıkmakta ve otoreaktif T hücre delesyonu gelişmektedir (53).

Th₁ rejeksiyonu arttırdığından fetüs için zararlıdır. Bu nedenle gebelikte Th₁ aşağı çekilmiş olarak tutulur. Raghupathy ve ark. tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda IFN- γ , TNF- α , TNF- β ve IL-2 gibi Th₁ sitokinlerin arttığını; buna karşılık sağlıklı gebeliklerde IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 gibi Th₂ cevabını gösteren sitokinlerin arttığını göstermişlerdir (54).

Th₂ artımına bağlı olarak maternal immün cevap hücresel immüniteden uzaklaşır ve antikor yapımına doğru yönelir. Bu nedenle gebeliğe özgü olan antijenlere karşı humoral tipte bir cevap oluşmaktadır. Ancak hücre içi patojenler (viruslar, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes v.b.*) lehine bir durum söz konusudur.

Genel olarak tekrarlayan düşüklere sebep olan immünolojik nedenleri 5 grup altında toplayabiliriz:

- 1) HLA antijenleri
- 2) Sperm antijenlerine karşı otoimmün cevap (ASA)
- 3) CD56⁺ ve CD19⁺ 5⁺ Naturel Killer (NK) hücreleri (Katil hücreler)
- 4) Antinükleer antikor (ANA) ve Deoksiribonükleik asit (DNA) yıkım ürünlerine karşı oluşmuş antikorlar
- 5) Antifosfolipid Antikorlar (APA)

1) HLA antijenleri:

Bu antijenler hücre yüzeyinde bulunan protein yapılarıdır. Bu proteinler, virus, bakteri ve kanser hücrelerini algılamak için çalışır ve immün sistemi bu yabancı hücrelere karşı antikor üretmek için uyarır. Gebelik, paternal ve plasental HLA antijenlerinden dolayı yabancı olarak algılanır. İmplantasyon, fetüsten derive olmuş yabancı hücrelerin maternal dokulara invazyonunu gerektirir. Gebeliğin oluşması ve güvenle sürmesi için fetal/paternal antijenlere karşı maternal bir immün tepkinin doğması gerekir. Anne ve babanın HLA (özellikle HLA sınıf-II ve HLA-B antijenleri) yakınlığı ne kadar fazla ise implantasyon şansı o kadar azalmakta ve tekrarlayan gebelik kayıplarının sayısı artmaktadır.

Plasental trofoblast hücrelerinin yüzeylerinde sınıf II HLA molekülleri bulunmaz. Trofoblast hücrelerinin yüzeyinde sadece sınıf I HLA antijenlerinden HLA-C, HLA-E ve HLA-G bulunur. Bu hücrelerin anne bağışıklık hücreleri ile yakın etkileşimi, fetüsün anneden olmadığını anlaşılmasına yol açar. NK (Naturel Killer) hücreleri, yüzeylerinde HLA olmayan hücreleri tanıyıp öldürebilirler. Trofoblast hücrelerinin yüzeyinde HLA ürününün olmaması onları NK hücrelerinin hedefi haline getirecektir. Trofoblast hücre yüzeyindeki HLA-C, HLA-E ve HLA-G, NK hücreleri aracılığıyla öldürülmeden korunmaya ek olarak başka rolleri de vardır. NK hücre reseptörleri ile trofoblastların HLA'larının etkileşimi sitokin salgısını yönlendirebilir (55).

Gebelikte maternal bir immün tepki vardır. Bu tepki 12. haftadan itibaren artan titrede anti-paternal HLA antikorlarının gelişmesi ve paternal antijenlere karşı maternal sitotoksik T hücre cevabının gelişmesi olarak belirir. Ancak fetal ve paternal antijenlere karşı T hücre cevabını regüle eden maternal T süpresör hücre etkinliği de ortaya çıkar (regülatuar T hücreleri-Tregs). Tregs'lerin mekanizması T hücre cevaplarını baskılamaktır. Böylece fetüse karşı gelişebilecek humoral ve sellüler tepkiler engellenir. T hücre baskılanmasının olduğu pek çok durumda yüksek düzeyde CD25 ifade eden CD4⁺ Tregs (CD4⁺ CD25⁺)'ler vardır. Maternal Tregs'lerce baskılanma mekanizmaları açıklık kazanmamıştır. Ayrıca Tregs'lerin efektör T hücrelerini inhibe edip etmediği de belirsizdir. T

hücreleri, uyarılma ve çoğalma için triptofana ihtiyaç duymaktadır. Muhtemeldir ki antijen sunan hücre (APC) varlığında APC'den exprese edilen, triptofan aminoasitini parçalayan indolamin 2,3 dioksijenaz (IDO) ile T hücreleri regülasyon fonksiyonlarını kazanabilirler. Bu hipotez tartışmalı da olsa kuvvetli bir ihtimaldir. Çünkü dendritik hücrelerden exprese edilen fonksiyonel IDO'ların insan ve farede T hücre cevaplarının güçlü inhibisyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (56). Diğer muhtemel mekanizmalar, maternal plasenta veya lenf nodlarından maternal-fetal aralığa Tregs'ler tarafından aktarılan regülatuar sitokinlerin (IL10, TGF- β) lokal üretimini kapsayabilir. Somerset ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda Tregs (CD4⁺ CD25⁺ hücreleri)'lerin insan gebeliğinde arttığı bildirilmektedir (57). Bu çalışma insan hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen ve hamilelik boyunca maternal immünitinin Tregs'ler tarafından düzenlendiğini tanımlayan ilk bildirimdir. Fetal yaşam maternal immün sistemin regülasyonuna bağlıdır. Somerset ve ark.'nın sonuçlarıyla paralellik gösteren diğer çalışmalarda, gebe kadınlardaki kan ve maternal desidual örneklerinde artmış CD4⁺CD25⁺ hücreleri saptanmıştır (58). Desidual CD4⁺CD25⁺ hücre oranı tekrarlayan düşükten yakınan hastaların örneklerinde, istemli düşüklerin örnekleriyle kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur. Bu korelatif ilişki CD4⁺CD25⁺ Tregs'lerin gebelik sırasında maternal immün toleransın ilerlemesine yardımcı olduğunu desteklemektedir.

Gebelik sırasında annede IgG tipi blokan antikor da gelişmektedir. Bu antikorlar paternal antijenleri bloke ederek, bunların maternal immün sistem tarafından tanınmasını önlemektedir. Böylece paternal antijenlere karşı maternal lenfosit cevabı baskılanmaktadır. Eğer paternal ve maternal HLA antijen benzerliği fazla ise bu blokan antikorlar üretilmez. Blokan antikorlar üretilmediği takdirde plasenta kamufle edilemez ve plasental hücreler de gelişemez ve sonuçta fetüs yabancı madde gibi algılanır ve fetüse karşı gelişen immün cevap ile düşük gelişir.

2) Sperm antijenlerine karşı otoimmün cevap:

Tekrarlayan düşüklerde %10 oranında sperm antijenlerine karşı antikörlara rastlanmaktadır. Bu antikörlar, serin ve etanolaminlere karşı oluşmuş antifosfolipid antikörları ile ilişkilidir. Antifosfolipid antikörların varlığı mevcut ise antisperm antikörların da varlığından şüphelenmek gerekmektedir.

3) Diğer lenfosit cevaplar:

İmmün sistemde 30 tip lenfosit meydana gelmektedir ve bunların denge içinde çalışması sağlık açısından gereklidir. Bu lenfositlerin 2 tipi düşüklere neden olur. Bütün kadınlarda bulunan bu 2 tipin, bazı kadınlarda fazla sayıda olması ile üreme bozuklukları gelişir. Bu 2 tip:

a) CD56⁺ NK hücreleri:

Bu hücrelerin sayısı artınca tekrarlayan düşükler de artar. Bu hücreler kan dışında, kadınların %2'sinde uterusda da bulunmaktadır. Bu hücreler sitokin üretmektedir. TNF- α en önemli sitokindir. Sitotoksiste (hücresel zarar) artınca embriyoda zarar görür.

b) CD19⁺ 5⁺ NK hücreleri:

Bazı kadınlarda bu hücreler artmış olarak tespit edilir. Bu hücreler progesteron, human corionic gonadotropin (HCG), östrojen hormonlarına karşı antikör gelişmesine neden olur. Bu antikörlar hormonların azalmasına ve gebelikte HCG' in yavaş artmasına neden olur. Progesteron, bağışıklık cevabını baskılayıcı etkiye sahiptir ve fetüsün yaşamını sürdürmesinde kısmen de olsa etkilidir (59). Hormonların azalması ile embriyo kalitesi azalır ve düşükler gelişir. Ayrıca bu hücreler serotonin, enkefalin, endorfin gibi nörotransmitterlere karşı da antikör oluşturmakta ve sonuçta embriyo kalitesini bozmaktadır.

4) ANA ve DNA yıkım ürünlerine karşı oluşmuş antikörlar:

Tekrarlayan düşüklerde %22 oranında bu immün problemler görülmektedir. Antinükleer antikörlar nükleoplazmadaki antijenlerle reaksiyona giren otoantikörlar olarak bilinir. Antinükleer antikör, tüm insanlarda mevcuttur. Ancak

seviyesi arttığında test pozitifliğinden söz edilir. Pratik uygulamalarda AFAS tanısı düşünülen hastalarda, APA ile birlikte ANA'lar blok olarak taranmaktadır. Anti DNA ise, hücrenin içindeki genetik yapılara karşı oluşmuş otoantikorlardır. Bu antikorlar implantasyon sırasında embriyo etrafında, implantasyondan sonra ise plasenta etrafında enflamasyona neden olmaktadır. Antifosfolipid antikor sendromu tanısında kullanılan ANA testinin hassasiyeti azdır. İlk kez 1957 yılında Holborow ve ark. ANA'ları göstermişlerdir. Kullandıkları IFA yöntemi hala tarama testi olarak kullanılmaktadır. Titre verilen bu testte 1/40 ve üzeri değerler pozitif olarak kabul edilir. Bazı kadınlarda bu değer 1/2500'e kadar yükselir. Bu durum diğer bazı otoimmün hastalıklar ile birlikteliği gösterebilir. Çünkü tekrarlayan düşüklerde bu değer daha düşüktür.

5) Antifosfolipid Antikorlar (APA):

Tekrarlayan düşükler ve doku hasarına neden olan tüm problemler fosfolipidlere karşı antikor gelişmesine yol açar. Fosfolipidler hücre zarında bulunur. Fosfolipidlere karşı gelişen antikorlar hücre fonksiyonlarını bozarak enflamasyon ve pıhtılaşma oluşturur.

Kardiyolipin, serin, fosfotidik asid, inositol, ethanolamin, gliserol molekülleri fosfolipidler içinde en önemlileridir. Bu moleküllere karşı IgM, IgG ve IgA tipinde antikorlar oluşur. Serin ve ethanolamin molekülü, embriyonun uterusu tutunmasını sağlamak için yapışkan görevi görür. Bu fosfolipid molekülleri, sınıtyotrofoblast hücrelere dönüşmeyi de sağlamakta ve fetüsün beslenmesi devam etmektedir. Ancak oluşan antikorlar ile implantasyon ve beslenme yetersizliği ile düşükler gelişmektedir. Gebelik öncesi veya gebeliğin erken dönemlerinde önlem alınmadığı takdirde gebelik kayıpları sık olarak oluşmaktadır (60).

Antifosfolipid antikor sendromu tanısı için, en az 3 ay ara ile yapılan testlerde, antifosfolipid antikorlarının saptanması gerekir ve bunlara tekrarlayan düşüklerin ve tromboembolik olayların eşlik etmesi gerekir (61).

II.3. KLİNİK GÖRÜNÜM

Antifosfolipid antikor sendromu, arteryel-venöz tromboz, trombositopeni, tekrarlayan düşükler gibi çeşitli bulgular ile seyredebilir. Temel patolojik değişiklik, vasküler veya perivasküler enflamasyon ile birlikte trombotik mikroanjiopatidir.

1) Arteryel ve venöz trombozlar: Arteryel trombozlar en sık serebral dolaşımında izlenir. Fakat, mezenterik, renal, koroner ve arteryel bypass greftlerinde de görülebilir. Venöz tromboz ise özellikle alt ekstremitelerde derin ven trombozu şeklinde gözlenir. Ayrıca renal, retinal ve hepatik venlerde de gözlenebilir. Derin ven trombozu AFAS'ın en sık görülen klinik bulgusudur. Antifosfolipid antikor sendrom'lu hastaların %29-55'inde derin ven trombozunun gözlendiği rapor edilmiştir ve hastaların yarıdan çoğunda pulmoner emboli gelişmiştir (62). Antifosfolipid antikor sendromu'nda venöz trombozlar, arteryel trombozlara göre daha sık gözlenir. Klinikte saptanan arteryel ve venöz trombozlar tekrarlayabilmektedir. Travma dışında gelişen venöz trombozlu hastaların yaklaşık %2'sinde AFAS saptanmıştır (63). Genç yaşta görülen ve etiyojisi bilinmeyen serebrovasküler olayların %25'inden AFAS sorumludur.

2) Pulmoner tutulum: Solunum sistemi bulguları arasında; pulmoner emboli, enfarktüs, pulmoner arteryel tromboz, pulmoner hipertansiyon, pulmoner mikrotromboz, akut respiratuvar distres sendromu (ARDS), intraalveolar pulmoner hemoraji, postpartum sendrom, fibroze edici alveolitis en sık görülenlerdir. Bu bulguların beraberinde sağ kalp yetmezliği gözlenebilir. Derin ven trombozlarının yaklaşık %50'sinde pulmoner emboliye rastlanır. Pulmoner emboli AFAS'lı hastalarda %30 oranında görülmektedir (64).

3) Kardiyovasküler tutulum: Kardiyolojik bulgular arasında, kardiyomyopati, ventrikül disfonksiyonları, kapak lezyonları, intrakardiyak kitle, kapak obstrüksiyonları, psödoenfektif endokardit bulunur. Kalp kapaklarında kalınlaşma ve nedeni tam olarak açıklanamayan vejetasyonlara sık rastlanmaktadır. Ancak APA ile myokard enfarktüsü sıklığı arasındaki ilişki

tartışmalıdır. İskemik kalp hastalıklarının %20'sinde AKA pozitif olarak saptanmıştır.

4) Hematolojik tutulum: Antifosfolipid antikor sendromu'nda %20-40 oranında trombositopeniye rastlanır. Bu tip trombositopenide genelde hemoraji gelişmez. Antifosfolipid antikor sendromu'nda bazan hemolitik anemi gözlenebilir. Direk coombs testi pozitifliğine primer AFAS'da %12, sekonder AFAS'lı hastalarda %40 oranında rastlanır.

5) Renal tutulum: Glomerül ve küçük arterlerde trombüsler gelişmektedir. Bunun sonucunda proteinüri, renal yetmezlik, hipertansiyon gibi bulgular ortaya çıkmaktadır. İntrarenal veya diğer büyük arter ve venlerde tromboz, hemodiyaliz hastalarında greft trombozu, post partum hemolitik üremik sendrom gözlenebilen diğer bulgulardır.

6) GİS tutulumu: Özofagus, mide, ince barsak ve kolonlarda oluşan iskemi ile GİS kanaması, abdominal ağrı, akut batın, perforasyon ile beraber nekroz ve gastrik ülserler rastlanır.

7) Dermatolojik bulgular: Antifosfolipid antikor sendrom'da yaklaşık %40 oranında cilt lezyonları gözlenebilmektedir. Kutanöz ülserasyon, deri nodülleri, livedoretikülaris, kutanöz gangren, nekrotizan vaskülit, eritematöz makül, tromboflebit gibi bulgulara rastlanmaktadır. Frances ve ark. 200 AFAS'lı hastanın %49'unda deri bulgularına rastlamışlardır (65). Diogenes ve ark. 60 AFAS'lı hastanın %40'ında deri bulgularına rastlamıştır (66). Deri bulguları arasında ise en sık livedoretikülaris'e rastlanmaktadır. Eğer livedoretikülaris bir hastada saptanıyorsa APA bulunması uygun olacaktır.

8) Obstetrik bulgular: Düşüklerin temel mekanizması, plasental dolaşımı engelleyen mikrotrombozların oluşmasıdır. Spiral arteriollerde daralma, intimada kalınlaşma, fibrinöz nekroz gibi patolojiler meydana gelmektedir. İmplantasyon ve fetüsün gelişimi için uterus ve damarlarının trofoblastik invazyonu gereklidir.

Antifosfolipid antikor, direk olarak trofoblastik hücrelere zarar verir ve embriyonel hücrelerle reaksiyona girer. Sonuçta immünolojik cevabın oluşması ile implantasyon önlenir. Fetüsün kaybı genelde 2. trimestırda olmaktadır. 20. hafta ve üzeri gebeliklerde düşük geçiren kadınların %10-15'inde APA saptanmıştır (67). Tekrarlayan ilk trimestır gebelik kayıplarında da %1 oranında AFAS tespit edilmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında %20 oranında AKA IgG veya IgM antikor pozitifliği bulunmuştur (68). Obstetrik olarak, invitro fertilizasyonda implantasyon başarısızlığı, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği (İ.Ü.G.G.) gibi diğer komplikasyonlar da gözlenir. Antifosfolipid antikor sendrom'lu kadınlarda fetal gelişme geriliği yaklaşık %30 oranında bulunmuştur (69). Yasuda ve ark. IgG AKA pozitif çıkan kadınlarda %12 oranında fetal gelişme geriliği saptarken, antikor saptanmayan kadınlarda %2 olarak bulmuşlardır (70).

II.4. TANI

Antifosfolipid antikor sendromu'nun tanı kriterleri ilk defa 1987 yılında Harris ve ark. tarafından açıklanmıştır. Daha sonra 1992'de Alarcon-Segovia ve ark., bu kriterleri biraz daha geliştirip Alarcon-Segovia tanı kriterlerini açıklamışlardır (71). Uluslararası Görüş Birliği Bildirgesi'nde (1999 yılında) tanı kriterleri biraz daha geliştirilmiştir (Tablo III). Antifosfolipid antikor sendromu'nun tanısı için gerekli olan serolojik ve klinik özellikler Sapporo kriterlerinde özetlenmiştir (72).

Antifosfolipid antikor sendromu tanısı, klinik bulgular ve laboratuvar testlerinin uygun biçimde kombine edilmesiyle konulabilir. En az bir klinik ve bir laboratuvar bulgusu varsa ve serolojik testler en az 6 hafta arayla iki kez pozitif bulunursa, AFAS tanısı konulabilmektedir. Bir hastada APA pozitif saptandığında ikinci kez titrede artış ve kalıcılık bakılmalıdır. Çünkü, saptanan antikorların çoğunluğu geçici alloimmuniteye bağlı olmakta ve bir yıl içerisinde kendiliklerinden kaybolmaktadır. Özellikle klinik olarak problemi olmayan asemptomatik kişilerde bu gerçeğin bilincinde olarak riskli tedavi yaklaşımlarından uzak durulmalıdır.

Tablo III. AFAS kriterleri üzerine Uluslararası Görüş Birliği Bildirisi (72).

Klinik kriterler:

1) Vasküler tromboz: Herhangi doku ya da organda meydana gelen 1 ya da daha fazla sayıda arteriyel, venöz ya da kapiller tromboz oluşumudur. Yüzeysel venöz tromboz dışında tromboz, radyoloji, Doppler ya da histopatoloji ile doğrulanmış olmalıdır. Histopatolojik olarak damar duvarında ciddi bir enflamasyon bulgusu olmaksızın tromboz varlığı gösterilmelidir.

2) Gebelik morbiditesi:

A) 10. gebelik haftası ya da sonrasında 1 ya da daha fazla sayıda morfolojik olarak normal fetüs kaybı

B) 34. gebelik haftası ya da öncesinde 1 ya da daha fazla sayıda morfolojik olarak normal prematür yenidoğan

C) 10. gebelik haftası öncesinde 3 ya da daha fazla sayıda açıklanamayan ardışık spontan abortus

Laboratuvar kriterleri:

1) Antikardiyolipin antikorları: Kanda IgM ya da IgG tipi AKA antikorlarının en az 6 hafta arayla 2 ya da daha fazla sayıda orta ya da yüksek titrede tespit edilmesi.

(β 2-GPI -bağlı AKA antikorlarına karşı standart ELISA yöntemi ile ölçüm yapılır)

2) Lupus antikoagulan antikorları: Plazmada lupus antikoagulanının en az 6 hafta arayla 2 ya da daha fazla sayıda Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Birliği'nin aşağıda belirtilen kriterlerine göre tespit edilmesi;

A) Tarama testinde fosfolipid-bağımlı koagülasyonun uzaması [ör: aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), kaolin pıhtılaşma zamanı, dilüe protrombin zamanı (PT)]

B) Tarama testinde tespit edilen uzamış koagülasyon zamanının, normal plazma ile karışım sonrasında düzelmemesi.

C) Tarama testinde tespit edilen uzamış koagülasyon zamanının fazla miktarda fosfolipid eklenmesi sonrasında kısalması ya da düzelmesi.

D) Diğer koagülopatilerin ya da heparinin ayırıcı tanıda ekarte edilmesi.

Antifosfolipid antikor'ların laboratuvarında gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla solid faz ELISA testleri kullanılmaktadır. Solid faz ELISA testleriyle APA'lar aranabilmektedir. ELISA testinde, antijen katı bir faza bağlanarak hareketsizleştirilmekte ve daha sonra da özgül birleşme enzim işaretli bir reaktif (konjugant) kullanılarak gösterilebilmektedir.

Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT), dilue Russel viper venom zamanı (DRVVT), kaolin pıhtılaşma zamanı (KCT) antifosfolipid antikorlarının varlığını göstermede tarama amaçlı kullanılan koagulasyon testleridir. APTT koagulasyon yolağında yer alan faktörlerin eksikliklerini ve bu faktörlerin inhibitörlerini taramak için kullanılan bir testtir. Taramada fosfolipid bağımlı pıhtılaşma testinin uzaması ve kombine testlerle uzamanın olduğunun teyit edilmesi tanıda yardımcıdır. APTT, dilue Russel viper venom zamanı (DRVVT) ve kaolin pıhtılaşma zamanı (KCT) antikoagulan etkiye sahip fosfolipide duyarlı pıhtılaşma testleridir (fosfolipid bağımlı koagulasyon testleri). Tarama testinde tespit edilen uzamış koagulasyon zamanı, fosfolipid eklenmesi sonrasında kısalmakta veya düzelmektedir. Russel viper venomu doğrudan faktör X' u aktive eden yılan zehiridir. Aktive faktör X fosfolipid ve faktör V ile birlikte protrombini trombine çevirerek pıhtılaşmayı sağlamaktadır.

II.5.TEDAVİ

Antifosfolipid antikor sendromu nedeniyle tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda etkin tedavi ile başarı sağlanabilir. Tedavi edilmemiş kadınlarda canlı bebek dünyaya getirme şansı %0-40 arasında değişmektedir. Uygun tedavi ile bu oran %70'lere çıkmaktadır. Gebelikte AFAS'ın tedavisinde en sık, bebe aspirini ve heparin kullanılmaktadır. Antifosfolipid antikor sendrom'lu hastalarda tek başına aspirinin etkisi yoktur. Aspirin ile beraber veya tek başına antikoagulan tedavi gerekmektedir. Bu iki ilaç, kanın pıhtılaşma sistemi üzerine etki etmektedir. Yüksek doz immunoglobulin tedavisinin diğer tedavilere bir üstünlüğü bulunmamıştır (73). Kortikosteroidler ve sitotoksik ilaçlar gibi diğer tedavi rejimleri AFAS'lı hastalarda denenmiş ancak etkili bulunmamıştır. Heparin plasentayı geçmediği için gebelikte güvenlidir (74). Heparin kullanımı sonrasında

ortaya çıkan en önemli komplikasyonlar, osteoporozla bağlı fraktürler ve trombositopenide meydana gelen trombotik olaylardır. Ağır osteoporozu önlemek için destek olarak kalsiyum ve vitamin D önerilmektedir. Trombositopeni gelişirse, heparin kesilerek diğer antikoagulan ilaçlar ile tedavi edilmelidir. Oral antikoagulan bir ilaç olan warfarin plasentaya geçtiği için teratojendir. Bu nedenle gebelerde kullanılmamalıdır (75).

Antifosfolipid antikor'ları pozitif olan ancak fetal kayıp öyküsü bulunmayan gebelerde tedavi tartışmalıdır (76). Tekrarlayan düşükleri olan ve düşük titrede APA pozitifliği dışında şikayeti olmayan gebelerde, heparin kullanımı ile canlı doğum oranı yönünden fark rapor edilmemiştir (77). Eğer fetal kayıp öyküsü mevcut, APA titresi yüksek ve tromboz şikayeti varsa, mutlaka tedavi verilmelidir.

III-GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Temmuz 2007-Temmuz 2008 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi polikliniklerine tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle başvuran 120 kadın hastada yapılmıştır. Hastalarda 2 veya daha fazla sayıda açıklanamayan ardışık gebelik kayıpları tespit edilmiştir. Yaş grupları ise 20-25 yaş, 26-30 yaş, 31-35 yaş ve 36 yaş ve üzerinden oluşmuştur.

Çalışmaya dahil edilmeyen kadınlar, enfeksiyonlar, sistemik hastalıklar, uterusun yapısal anomalileri ve kişisel veya aileden gelen tromboz öyküleri nedeniyle düşük geçirenleri içermektedir. Tüm katılımcılar bilgilendirilip çalışma için izin alınmıştır. Kan örnekleri, çalışmaya katılan hasta gruplarından elde edilmiştir.

Hastalardan alınan kanların serumları 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. Serumlar testlerin yapıldığı güne kadar -20°C'de saklanmıştır. Kan örneklerinde ELISA tekniği kullanılarak, AFAS ile ilişkili olan antikorlar aranmıştır. Antikorlar;

AKA IgG

AKA IgM

AKA IgA

anti β 2-GPI IgG

anti β 2-GPI IgM

anti β 2-GPI IgA

anti-PS IgG

anti-PS IgM

antiprotrombin IgG

antiprotrombin IgM

antiprotrombin IgA

antiannexin V IgG

antiannexin V IgM

Ayrıca VDRL-sifiliz testi, IFA ile ANA, antiDNA testleri çalışılmıştır.

III.1. ELISA

Bu yöntem, antijen antikor ilişkisini, antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırma temeline dayanır. Çok kullanılan, duyarlı ve spesifik bir testtir. ELISA yöntemi ile hem antikor ve hem de antijen aranabilmektedir. Oluşturulan antijen-antikor kompleksine enzim ile işaretli antiglobulin ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antikor (veya antijen) varsa renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Renk oluşumu kimyasal bir olaydır ve enzimin aktivitesine bağlıdır. Enzimle reaksiyona giren substratın spektrofotometrik ölçümü araştırılması gereken antikor konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (78).

ELISA testinin basamakları:

1. Katı faz olarak, düz tabanlı polistren plaklar kullanılabilir. Katı faza bilinen antikor (veya antijen) bağlanır. Katı faza antikor (veya antijen) bağlandığı için hazırlanan ELISA plağı ile serum örneklerinde bu antikor (veya antijen)'a özgül antijen (veya antikor) varlığı araştırılır.

2. Antikor (veya antijen) bağlı çukurlara serum örnekleri eklenerek oda ısısında veya 37°C'de belirli süre bekletilir. İnkübasyon sonunda eklenen serum örnekleri dökülerek çukurlar tamponlanmış su ile yıkanır. Çukura eklenen serum içerisinde özgül antijen (veya antikor) var ise katı fazdaki antikor (veya antijen)'a bağlandığı için yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaz. Çukura eklenen serum örneğinde özgül antijen (veya antikor) yok ise katı fazdaki antikor (veya antijen)'a bağlanma olmaz ve yıkama işlemi ile eklenen serum örneği uzaklaştırılmış olur.

3. Katı fazdaki antikor (veya antijen)'a bağlanmış olan antijen (veya antikor)'i saptamak amacı ile çukurlara Fc kısmı enzim ile işaretli anti-immunoglobulin (konjugant) antikor eklenir. Konjugant yapısına eklenen enzim genellikle peroksidaz enzimidir. Alternatif olarak alkalin fosfat, glukoz oksidaz, beta D-galaktozidaz gibi başka enzimler de işaretleme için kullanılmaktadır.

Konjugant eklendikten sonra belirli bir süre beklenmekte ve konjugant döküldükten sonra tamponlanmış su ile birkaç kez yıkanmaktadır. Eklenmiş olan konjugant katı fazdaki özgül antikor (veya antijen)'a bağlandığı için ikinci yıkama işlemi ile çukurdan uzaklaştırılmamaktadır.

4. Ortamda bağlı kalan konjugantın gösterilmesi amacıyla çukurlara konjuganttaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir (enzim peroksidaz ise, substrat olarak ortofenilen diamino benzidin-OPD veya tetrametil benzidin-TMB gibi kromojen madde içeren hidrojen peroksit kullanılmaktadır). Reaksiyonun renklenmesinden sonra enzim aktivitesini durdurmak için H₂SO₄ eklenir. Oluşan rengin koyuluğu (optik dansitesi) spektrofotometre ile okunur.

III.2. ANTİKOR ÖLÇÜMLERİ

Çalışmaya 120 hasta serumu dahil edilmiştir. Her bir hasta serumu, Tablo IV'de belirtilen antifosfolipid antikorları açısından test edilmiştir. Her bir parametre için birer adet test stribi kullanılmıştır.

Tablo IV. Antifosfolipid antikor tipleri.

Antifosfolipid antikor	İmmünoglobulin (Ig)
Antikardiyolipin	IgG
Antikardiyolipin	IgM
Antikardiyolipin	IgA
Antibeta2-glikoprotein I	IgG
Antibeta2-glikoprotein I	IgM
Antibeta2-glikoprotein I	IgA
Antifosfotidilserin	IgG
Antifosfotidilserin	IgM
Antiprotrombin	IgG
Antiprotrombin	IgM
Antiprotrombin	IgA
Antiannexin V	IgG
Antiannexin V	IgM

Bu antikorların seviyeleri Orgentec kiti (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany) kullanılarak ELISA ile ölçülmüştür. Testler üretici firmanın önerisi doğrultusunda çalışılmıştır.

Serum örneklerinin in vitro tayini için, Orgentec GmbH (Almanya) tarafından üretilen ELISA tabanlı tam otomatik olarak düzenlenmiş 'Alegria' cihazı kullanılmıştır.

Diagnostik bir araç olan Alegria, aracın yüklenişi dışındaki tüm basamakları otomatik olarak yürütmüştür.

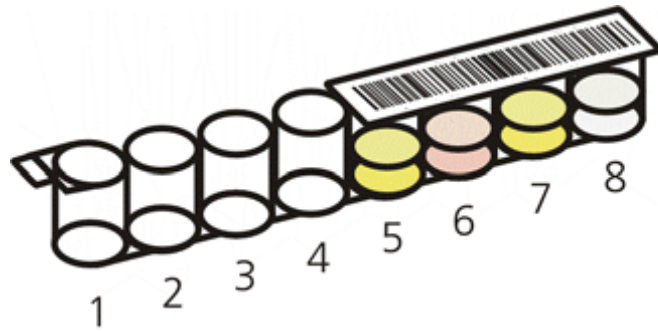
Bir çalışmanın bitiminden sonra sonuçlar değerlendirilmiştir.

III.2.1 Gerekli materyaller:

- Vorteks karıştırıcı
- 10 μ l'lik pipetler
- 1000 ve 2500 ml'lik ölçü kapları
- Distile ya da deiyonize su

III.2.2. Kitin içeriği:

- Test sribleri tek bir tayin için dizayn edilmiştir.
- Stripler, barkodlu ve 8 kuyucuktan oluşmuştur.
- Kuyucuklar, teste bağlı olarak, ayrı ayrı antijenler (kardiyolipin, beta2-glikoproteinI, fosfotidilserin, protrombin ve annexinV) ile kaplanmıştır.



Tablo V. Kitin içeriği.

Hücreler	Reajanlar
1-2	Boş, kaplanmamış kuyucuklar
3-4	Spesifik antijenler ile kaplanmış kuyucuklar
5	Kontrol (sarı; hastalık ile ilişkili markırları barındıran bir serum ve tampon matriksi)
6	Enzim konjugantı (açık kırmızı: peroksidazlar ile işaretlenmiş anti-insan antikorlarından oluşan kuyucuk)
7	Sample buffer (sarı; Tris, $\text{NaN}_3 < \% 0,01$ (w/w)),
8	TMB substrat (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidin)

III.2.3. Ayraçların hazırlanması:

- 20 ml Yıkama Solüsyonu (PBS),
- 2,5 ml Hidroklorik asit (HCl) içeren Sistem Sıvısı.

Yıkama Solüsyonu:

Kullanımdan önce tamponlanmış yıkama solüsyonu içeriği (50x) 1000 ml'lik final hacim elde edinceye kadar distile su ya da deiyonize su ile seyreltilmiştir. Seyrelmiş yıkama tamponu ayraç haznesine transfer edilmiştir.

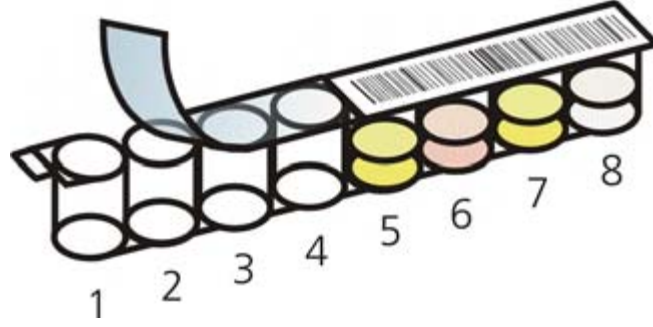
Sistem Sıvısı:

Sistem sıvısı konsantresini kullanmadan önce distile ya da deiyonize su ile final hacmi 2500 ml olacak şekilde x1000 seyreltilmiştir. Seyrelmiş sistem sıvısı ayraç haznesine transfer edilmiştir.

III.2.4. Test Prosedürü:

- Buzdolabından kitler alınıp, en az 30 dakika beklenerek oda ısısına gelmesi sağlanmıştır.
- Test edilecek her örnek için bir adet strip alınmıştır.
- Gerekli tahlil ve hasta verileri cihaza girilmiştir.
- Örnekler bir vorteks kullanılarak karıştırılmıştır.

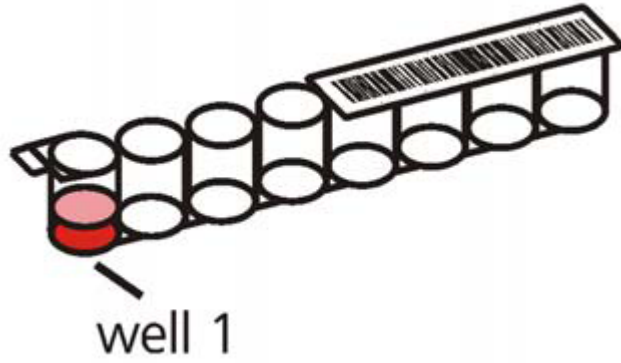
-Test stribindeki boş kuyucukları kaplayan folyo çıkartılmıştır.



Sadece gerekli bantlardaki boş kuyucukları (1'den 4'e) kapatan folyo çıkarılmıştır.

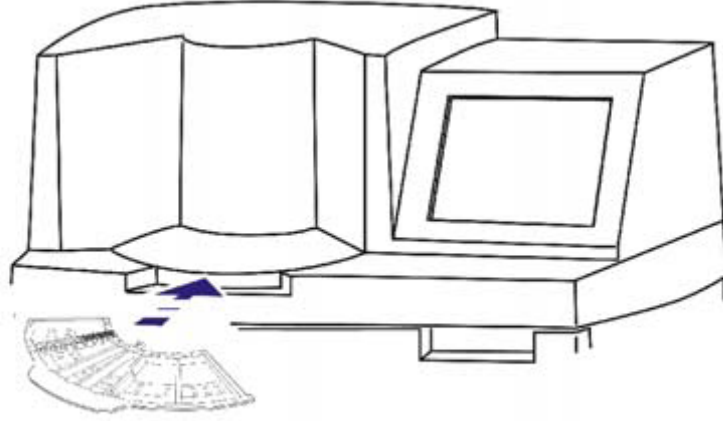
5-8. kuyucukları kapayan barkodlu folyoları çıkartılmamıştır.

-Pipet ile 1. kuyucuğun tabanına 10 µl seyreltilmemiş örnek aktarılmıştır.



-Test stribi SysTray'e yerleştirilmiştir.

-Doğru SysTray pozisyonu (A pozisyonunda SysTray A, B pozisyonunda SysTray B, C pozisyonunda SysTray C) dikkate alınarak araca yüklenmiştir.



-Kullanıcı kılavuzu'nda belirtildiği gibi çalışma süreci başlatılmıştır. Tüm çalışma kademeleri cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar yaklaşık 150 dakika içinde elde edilmiştir.

III.2.5. Testin prensibi:

Reaksiyon basamakları :

-Pozitif örneklerdeki otoantikorlar kuyucukların yüzeyinde bulunan antijene bağlanırlar.

-İnkübasyon sonrasında spesifik olmayan bağlı moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması için bir yıkama işlemi yapılır.

-Konjugant immobilize antikor-antijen kompleksine bağlanır.

-İnkübasyondan sonra bağlı olmayan konjugantın ortamdan uzaklaştırılması için ikinci bir yıkama işlemi gerçekleştirilir.

-Substrat solüsyonunun eklenmesi inkübasyon esnasında renk oluşumu ve hidrolizasyon ile sonuçlanır.

-Mavi renk konsantrasyonu antikor-antijen kompleksi konsantrasyonu ile ilişkilendirilir ve 650 nm'de fotometrik olarak ölçülebilir.

III.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi:

Çalışma tamamlandığında sonuçlar otomatik olarak cihaza yüklenmiştir ve kalibrasyon eğrisine göre hesap edilerek, floresan değerleri U/ml birimine çevrilmiştir.

Değerlendirme kit prosedüründe belirtildiği gibi yapılmıştır. Her bir antifosfolipid antikor tipi için kantitatif olarak çıkan sonuçlar, kit prosedüründe belirtilen değerler çerçevesine bağlı olarak yorumlanmıştır.

Antifosfolipid antikorlar için belirtilen aralıklar:

Antikardiyolipin IgM:

Negatif (U/ml)	Pozitif (U/ml)
<7	≥7

Antikardiyolipin IgG, IgA:

Negatif (U/ml)	Pozitif (U/ml)
<10	≥10

Antibeta2-glikoprotein IgM, IgG, IgA:

Negatif (U/ml)	Borderline (U/ml)	Pozitif (U/ml)
<5	5-8	>8

Antifosfotidilserin IgM, IgG:

Negatif (U/ml)	Pozitif (U/ml)
<10	≥10

Antiprotrombin Ig M, IgG, IgA:

Negatif (U/ml)	Pozitif (U/ml)
<10	≥10

Antiannexin V IgM, IgG:

Negatif (U/ml)	Borderline (U/ml)	Pozitif (U/ml)
<5	5-8	>8

Antifosfolipid antikorlarının sonuçları değerlendirilirken üretici firmanın belirlediği aralıkların üzerindeki değerler pozitif olarak, aralığın arasındakiler borderline (sınırdaki) olarak, aralığın altındakiler ise negatif olarak yorumlanmıştır.

III.3. IFA ANA

Bu yöntem ile 120 hasta serumuna ANA çalışması yapılmıştır. Çalışmada ANA Mosaic HEP-20-10/Liver Monkey (Euroimmun, Germany) ticari kiti kullanılmıştır. Testler üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

Hasta serumları 1/40 oranında dilue edilmiştir. Hep-2 ve sonuçların desteklenmesi için primat karaciğer hücreleri bulunan lamalar kullanılmıştır. PBS-Tween 20 karışımı, konjugant solüsyonu, lamel, kaplama solüsyonu ve immunfloresan mikroskop kullanılarak X40'luk objektifle floresan vermelerine göre değerlendirme yapılmıştır.

IFA testinin prensibi:

İndirek floresan yöntemde, araştırdığımız antijene özgül birincil antikör (serum) ve birincil antikora bağlanabilen fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli ikincil bir antikör kullanılmıştır.

-Doku kesitinin üzerine birincil antikör damlatıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır.

-Yıkama işleminden sonra eğer bağlanma olmuşsa birincil antikör yıkamakla uzaklaştırılmaz. Bağlanmış olan birincil antikör, FITC ile işaretli ikincil antikör ile saptanmıştır. İkincil antikör bağlanma nedeniyle yıkama işlemi ile uzaklaştırılmaz.

-Lamin üzerine immersiyon damlatılıp lamel ile kapatılmıştır ve floresan mikroskopta incelenmiştir.

-Bağlanmanın olduğu yerde floresan mikroskopta yeşil renkli ışımaya alanları görülmüştür.

III.4. IFA antiDNA

Bu yöntem ile 120 hasta serumuna anti DNA çalışması yapılmıştır. Substrat olarak *Crithidia luciliae* içeren lamalar kullanılmıştır (Euroimmun, Germany). Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

Hasta serumları 1/10 oranında fosfat tamponu (PBS) ile dilue edilmiştir. PBS-Tween 20 karışımı, konjugant solüsyonu, lamel, kaplama solüsyonu ve immunfloresan mikroskop kullanılarak X40'lık objektifle floresan vermelerine göre değerlendirme yapılmıştır. Floresan mikroskopta nükleus ve bazal yapı arasında yer alan kinetoplastdaki parlak floresans olumlu, nükleus veya bazal yapıda gözlenen floresans ise olumsuz olarak değerlendirilmiştir.

III.5.VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) Sifiliz Testi

Antifosfolipid antikor sendromu ile ilişkili sifiliz testlerinin yalancı pozitifliğini araştırmak amacıyla VDRL sifiliz testinden yararlanılmıştır. Çalışmaya alınan 120 hasta serumuna VDRL testi uygulanmıştır. VDRL testinde kullanılan antijen %0,03 kardiyolipin- %0,9 kolesterol- %0,2 lesitin'den oluşturulmuştur (Immutrep VDRL Antijen, Omega Diagnostics). Hasta serumları 56°C'de 30 dakika inaktive edilmiştir. İnaktive edilmiş serum örneğinden 50 µl lam üzerine konmuştur. Üzerine kardiyolipin-kolesterol-lesitin'den oluşmuş antijenden 22 µl ilave edilmiştir. Lam, 180 rpm'de 4 dakika çevrilmiştir. Sonra hemen mikroskopta 100x büyütmede bakılmıştır. Antijen ve antikor komplekleri eğer agregat oluşturmuşsa sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

IV. BULGULAR

Çalışma, tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle incelenen 120 kadın hasta üzerinde yapılmıştır. Tekrarlayan düşük geçiren 120 gebe kadına ait serum örnekleri ELISA yöntemi kullanılarak, antifosfolipid antikoları (antikardiyolipin IgG-IgM-IgA, antibeta2-glikoprotein I IgG-IgM-IgA, antifosfolipidlerin IgG-IgM, antiprotrombin IgG-IgM-IgA, antiannexin V IgG-IgM) açısından test edilmiştir. Çalışmaya alınan hasta serumlarında IFAT yöntemi ile ANA ve antiDNA parametrelerine de bakılmıştır. Ayrıca VDRL pozitifliği de değerlendirilmiştir.

Çalışmaya alınan hasta grubundaki kişilerin yaşları birbirine yakın bulunmuştur. Hastaların 51'i 20-25 yaş, 42'si 26-30 yaş, 16'sı 31-35 yaş aralığında tespit edilmiştir. Hastaların 11'i ise 36 yaş ve üzeri kişilerden oluşmuştur.

Çalışmaya katılan hastalardan sadece birinde 7 düşük, birinde de 6 düşük geçirme öyküsü tespit edilmiştir. Hastaların 2'sinde ise 5 düşük, 7'sinde 4 düşük geçirme öyküsü mevcut bulunmuştur. Tekrarlayan gebelik kaybı geçirmiş hastaların 63'ü 3 düşük geçirmiştir. Hastaların 46'sında ise 2 düşük geçirme öyküsü saptanmıştır.

Tekrarlayan düşük yapmış 120 kadın hastanın 108'inin gebelikleri erken düşük, 2'sinin geç düşük ile sonlanmıştır. Bu hastaların 10'unda ise erken ve geç düşük geçirme öyküsü tespit edilmiştir. Erken ve geç düşük geçirmiş bu 10 kişinin 3'ü 20-25 yaş, 4'ü 26-30 yaş, 3'ü 31-35 yaş aralığında bulunmuştur.

Tekrarlayan gebelik kaybı geçirmiş 120 hastanın 17'sinde en az bir canlı doğum mevcut bulunmuştur. Canlı doğum yapmış 17 kişinin 6'sı 20-25 yaş, 7'si 26-30 yaş, 4'ü 31-35 yaş aralığında tespit edilmiştir.

Tablo VI. Hastaların demografisi.

Hasta yaşı	20-25 yaş	26-30 yaş	31-35 yaş	36 yaş ve üzeri	
Hasta sayısı	51	42	16	11	
Düşük Sayısı	2 düşük	21	17	6	2
	3 düşük	29	23	7	4
	4 düşük	1	1	2	3
	5 düşük	0	0	1	1
	6 düşük	0	0	0	1
	7 düşük	0	1	0	0
Erken düşük	48	37	13	10	
Geç düşük	0	1	0	1	
Erken ve geç düşük	3	4	3	0	
Canlı doğum	6	7	4	0	

Antifosfolipid antikor seropozitif ve seronegatif hastalar için yaş, düşük sayısı, erken, geç, erken ve geç düşük durumu ve canlı doğum değerlendirmeleri TabloVI’de verilmiştir. Hastaların 20 yaş veya 36 yaş üzeri olması ile düşük sayılarının artması ya da azalması arasında hiçbir anlamlı fark bulunmamıştır. Hastaların genç veya orta yaşlı olması ile gebeliklerinin erken ya da geç düşük ile sonlanması ya da canlı doğum gerçekleştirme durumları arasında da bir ilişki bulunamamıştır.

Çalışmaya alınan 120 serum örneğinin 103’ü (%85,8) en az bir APA epitobu için seropozitif sonuç vermiştir. Serum örneklerinin 10’u ise (%8.4) test edilen tüm epitoplara için seronegatif sonuç vermiştir. Çalışılan 120 serum örneğinin 7’si ise (%5.8) en az bir epitop için borderline sonuç vermiştir.

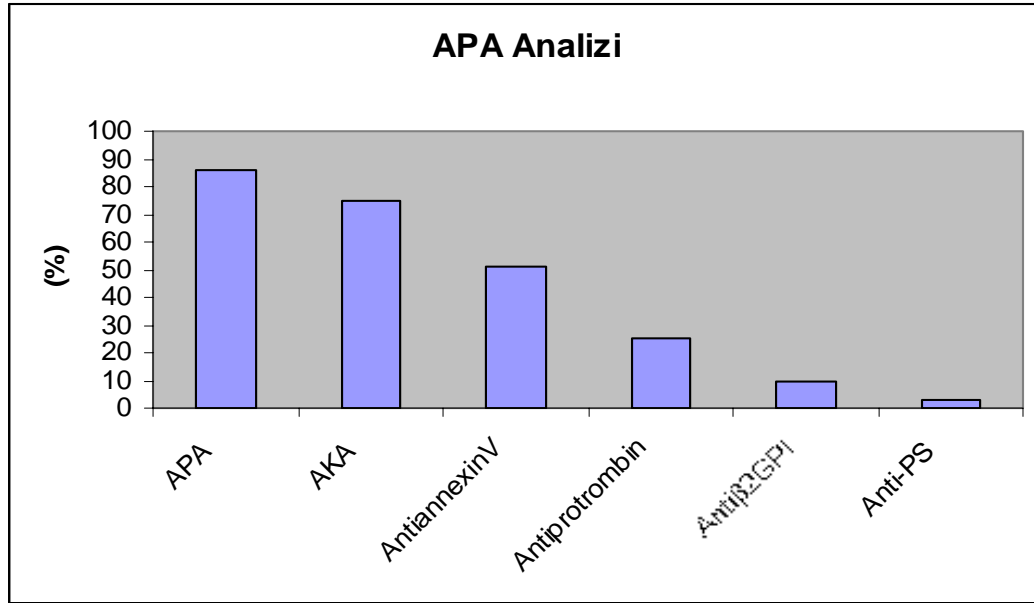
Pozitif sonuç veren hastalarda sıklıkla yükselen antikor tipi AKA (%75) olarak bulunmuştur. Bunu antiannexin antikorları (%50.8) takip etmiştir. Azalan

sırayla, antiprotrombin (%25), anti β 2-GPI (%10) ve anti-PS (%3.3) antikorları tespit edilmiştir. Antifosfolipid antikorlarının dağılımı Tablo VII’de gösterilmiştir.

Tablo VII. Antifosfolipid antikorlarının dağılımı.

APA (%)	AKA (%)	Anti β 2GPI(%)	Anti-PS (%)	AntiannexinV(%)	Antiprotrombin (%)
85.8	75	10	3.3	50.8	25

Antifosfolipid antikorların dağılımı yüzde olarak analiz edilmiştir (Grafik I).



Grafik I. Antifosfolipid antikorların dağılımı.

Bu çalışmada, fosfolipid (kardiyolipin, fosfotidilserin) ve fosfolipid bağlayıcı proteinlerin (beta2-glikoprotein I, annexin V ve protrombin) birlikteliğinin sıklığı da görülmüştür (Tablo VIII).

Tablo VIII. Fosfolipid ve fosfolipid bağlayıcı protein birlikteliği (%).

AKA IgG-anti β 2GPI IgG	10.7
AKA IgM-anti β 2GPI IgM	3.9
Antifosfotidilserin IgM-antiannexin V IgM	8.3
Antifosfotidilserin IgM-antiprotrombin IgM	19.0

Anti β 2-GPI ile AKA birlikteliği; %10.7'i AKA IgG-anti β 2GPI IgG ile, %3.9'u AKA IgM-anti β 2GPI IgM ile korele bulunmuştur.

Antiannexin V ile antifosfolipidlerin birlikteliği; %8.3 oranında antifosfolipidlerin IgM-antiannexin V IgM ile korele bulunmuştur.

Ayrıca pozitif saptanan antiprotrombin antikorları; %19.0 oranında antifosfolipidlerin IgM-antiprotrombin IgM antikorları ile korele bulunmuştur.

ELISA yöntemi ile seronegatif, seropozitif ve borderline saptanan antifosfolipid antikorların dağılımı, Tablo IX'da gösterilmiştir. Antifosfolipid antikorlarından özellikle IgM tipi, IgG ve IgA antikorları ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda bulunmuştur.

Tablo IX. APA için seronegatif, seropozitif ve borderline hastalar.

Ig	APA	Seropozitif	Seronegatif	Borderline
IgM	Kardiyolipin	62 (%51.6)	50 (%41.7)	8 (%6.7)
	Beta2-glikoprotein I	3 (%2.5)	117 (%97.5)	0 (%0)
	Fosfotidilserin	4 (%3.3)	116 (%96.7)	0 (%0)
	Protrombin	22 (%18.3)	98 (%81.7)	0 (%0)
	Annexin V	53 (%44.2)	64 (%53.3)	3 (%2.5)
IgG	Kardiyolipin	39 (%32.5)	78 (%65)	3 (%2.5)
	Beta2-glikoprotein I	4 (%3.3)	116 (%96.7)	0 (%0)
	Fosfotidilserin	0 (%0)	120 (%100)	0 (%0)
	Protrombin	5 (%4.2)	115 (%95.8)	0 (%0)
	Annexin V	13 (%10.8)	107 (%89.2)	0 (%0)
IgA	Kardiyolipin	0 (%0)	120 (%100)	0 (%0)
	Beta2-glikoprotein I	7 (%5.8)	113 (%94.2)	0 (%0)
	Protrombin	5 (%4.2)	115 (%95.8)	0 (%0)

Antikardiyolipin antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında antikardiyolipin IgM, IgG, IgA durumları test edilmiştir. AKA IgG ve/veya AKA IgM seropozitifliği (toplam) %75 (90/120) olarak bulunmuştur. Sadece IgM pozitifliği %42.5 (51/120) olarak tespit edilmiştir. Sadece IgG pozitifliği ise %23,3 (28/120) hastada bulunmuştur. 120 hastanın 8'i (%6.7) AKA IgM açısından, 3'ü (%2.5) AKA IgG açısından borderline sonuç vermiştir. AKA IgA pozitifliğine ise rastlanmamıştır. Hastalarda daha yüksek oranda AKA IgM tipi tespit edilmiştir. Yükselen IgG ve yükselen IgM aynı anda (total) 11/120 hastada (%9.2) pozitif bulunmuştur (TabloX).

Tablo X. Antikardiyolipin antikorların analizi.

	Toplam (%) (IgM ve/veya IgG)	IgM (%)	IgG (%)	IgA (%)	Total(%) (IgG,IgM)
AKA	90/120 (%75)	51/120 (%42.5)	28/120 (%23.3)	0/120 (%0)	11/120 (%9.2)

Antibeta2-glikoprotein I antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında anti β 2-GPI IgM, IgG, IgA durumları test edilmiştir. Anti β 2-GPI antikorları toplamda %10 (12/120) olarak bulunmuştur. Sadece IgM pozitifliği %1.7 (2/120), sadece IgG pozitifliği %2.5 (3/120), sadece IgA pozitifliği ise %5.0 (6/120) olarak bulunmuştur. Hastalarda daha yüksek oranda IgA tipi tespit edilmiştir. Yükselen IgG, yükselen IgM ve yükselen IgA aynı anda 1/120 hastada (%0,8) pozitif bulunmuştur (Tablo XI).

Ayrıca pozitif saptanan anti β 2-GPI antikorlarının AKA ile birlikteliği görülmüştür. Bu birlikteliğin %10.7'si AKA IgG-anti β 2-GPI IgG ile, %3.9'u AKA IgM- β 2-GPI IgM ile korele bulunmuştur.

Tablo XI. Antibeta2-glikoprotein I antikorların analizi.

	Toplam (%) (IgM ve/veya IgG,IgA)	IgM (%)	IgG (%)	IgA (%)	Total(%) (IgG,IgM,IgA)
Antiβ2- GPI	12/120 (%10)	2/120 (%1.7)	3/120 (%2.5)	6/120 (%5.0)	1/120 (%0.8)

Antifosfotidilserin antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında anti-PS IgM, IgG, durumları test edilmiştir. Anti-PS antikorları toplamda %3.3 (4/120) oranında pozitif bulunmuştur. Anti-PS antikorları açısından pozitif sonuç veren 4 hastanın hepsi de sadece IgM antikorları için pozitif sonuç vermiştir (Tablo XII).

Tablo XII. Antifosfotidilserin antikorların analizi.

	Toplam (%) (IgM ve/veya IgG)	IgM (%)	IgG (%)	Total (%) (IgG,IgM)
Anti-PS	4/120 (%3.3)	4/120 (%3.3)	0/120 (%0)	0/120 (%0)

Antiprotrombin antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında antiprotrombin IgM, IgG, IgA durumları test edilmiştir. Antiprotrombin antikorları toplamda %25 (30/120) oranında pozitiflik vermiştir. Hastaların 21/120'sinde (%17.5) antiprotrombin IgM, 4/120'sinde (%3.3) antiprotrombin IgG, 4/120'sinde (%3.3) antiprotrombin IgA pozitif bulunmuştur. Hastalarda daha yüksek oranda IgM tipi tespit edilmiştir. Yükselen IgG ve yükselen IgM ve IgA aynı anda 1/120 hastada (%0,8) pozitif bulunmuştur. (Tablo XIII).

Ayrıca pozitif saptanan antiprotrombin antikorları, %19.0 oranında antifosfotidilserin IgM-antiprotrombin IgM antikorları ile birlikte bulunmuştur.

Tablo XIII. Antiprotrombin antikorların analizi.

	Toplam (%) (IgM ve/veya IgG,IgA)	IgM (%)	IgG (%)	IgA (%)	Total(%) (IgG,IgM,IgA)
Antiprotrombin	30/120 (%25)	21/120 (%17.5)	4/120 (%3.3)	4/120 (%3.3)	1/120 (%0.8)

Antiannexin V antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında antiannexin V IgM, IgG, durumları test edilmiştir. Antiannexin V antikorları toplamda %50.8 (61/120) olarak bulunmuştur. Hastaların 48/120'sinde (%40.0) sadece antiannexin V IgM,

8/120'sinde (%6.7) sadece antiannexin V IgG seropozitif bulunmuştur. Ayrıca 3/120 (%2.5) hastada antiannexin V IgM borderline sonuç vermiştir. Hastalarda daha yüksek oranda IgM tipi tespit edilmiştir. Yükselen IgG ve yükselen IgM aynı anda 5/120 (%4.2) hastada pozitif bulunmuştur (Tablo XIV).

Ayrıca pozitif saptanan antiannexin antikorları, %8.3 oranında antifosfolipidlerin IgM-antiannexin IgM antikorları ile birlikte bulunmuştur.

Tablo XIV. Antiannexin antikorlarının analizi.

	Toplam (%) (IgM ve/veya IgG)	IgM (%)	IgG (%)	Total(%) (IgG,IgM)
Antiannexin	61/120 (%50.8)	48/120 (%40.0)	8/120 (%6.7)	5/120 (%4.1)

Antinükleer antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında ANA durumları test edilmiştir. Hastaların 100/120'si (%83.3), 1/40 ile 1/200 arasındaki titrelerde pozitif sonuç vermiştir. Çalışılan hasta serumlarının 20/120'sinde (%16.7) ANA negatif bulunmuştur.

AntiDNA antikorlarının analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında antiDNA antikorlarının durumları test edilmiştir. Ancak 120 hasta serum örneğinin hiçbiri antiDNA açısından pozitif sonuç vermemiştir.

VDRL analizi:

Tekrarlayan düşük geçiren 120 kadında VDRL durumları test edilmiştir. Hastaların 11/120'si (%9.2) VDRL açısından pozitif sonuç vermiştir.

V. TARTIŞMA

Antifosfolipid antikor sendromu, serumda antifosfolipid antikorların varlığı, tekrarlayan gebelik kayıpları, venöz ve arteryel trombozlar veya trombositopeni ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Antifosfolipid antikorların antijenik hedefleri negatif yüklü fosfolipidler ve serum fosfolipid bağlayıcı proteinlerden oluşmaktadır. Fosfolipidleri hedefleyen antikorların (kardiyolipin, fosfotidilserin) veya fosfolipidlere bağlanan plazma proteinlerin (beta2-glikoprotein I, protrombin ve annexin V) üretimini içeren otoimmün faktörler tekrarlayan düşükler için risk faktörüdür. Antifosfolipid antikorlar, koagulasyonu kontrol eden fosfolipidler ve fosfolipid bağlayıcı proteinlerin fonksiyonları üzerine etki etmektedir.

Tekrarlayan düşükler ve antifosfolipid antikorları arasındaki birliktelik AFAS'ın sürekli olarak belirtilen bir özelliğidir (79). Antifosfolipid antikor sendromu'nun gebelik üzerindeki etkisi, anormal plasenta fonksiyonu ile ilişkilidir. Desidual spiral arteriollerde daralma, fibrinöz nekroz, intimada kalınlaşma, Antifosfolipid antikor sendromu'na bağlı fetal kayıplarda izlenmektedir. Antifosfolipid antikor sendromu olan olgularda plasentanın değişik fonksiyonlarında bozukluklar mevcuttur. Bunların başında implantasyon bozukluğu gelmektedir.

İmplantasyon başarısızlığında antifosfolipid antikorlarının rolü son yıllarda yapılan birçok araştırmanın odağı olmuştur ve halen tartışma konusudur. Elde ettiğimiz sonuçlar, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda antifosfolipid antikorların rolünün yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, tekrarlayan düşük geçiren 120 hastada antifosfolipid antikorları %85,8 oranında pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu antifosfolipid antikorlarından özellikle IgM tipi kardiyolipin antikorları (%42.5) yüksek oranda pozitif olarak saptanmıştır. Bunu da %40.0 oranında antiannexin IgM antikorları takip etmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda hastaların yaşları, önceden geçirmiş oldukları düşükler, canlı doğum gerçekleştirme öyküleri, erken veya erken ve geç düşük

geçirme öyküleri arasında hiçbir anlamlı fark bulunamamıştır. Franklin ve ark. 2002 yılında 79 tekrarlayan düşük geçirmiş hastada yaptıkları bir çalışmada, hastaların yaşı, önceki gebelikleri, önceki canlı doğumları, önceki düşükleri arasında anlamlı hiçbir fark bulamamışlardır (80).

Antikardiyolipin antikorları'nın tekrarlayan gebelik kaybı ile birlikteliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Tekrar eden düşüğü olan 500 ardışık kadınla yapılan bir çalışmada, AKA IgG %37, AKA IgM %36 oranında pozitif olarak bildirilmiştir (80). AKA'nın tekrarlayan düşük ile birlikteliği üzerine birçok araştırmalar yapılmıştır. Araştırmalarda AKA'nın varlığının fetal kayıp ile sonlanan bir protrombotik durumu hızlandığı ve tekrarlayan düşükler ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (80) .

Yapılan bir araştırmada,178 gebe kadında AKA (IgG ve IgM) incelenmiştir. IgG ve IgM antikorlarından biri veya ikisi pozitif olan 47 kadın söz konusu iken (%26.4), her iki immunoglobulin 131 kadında (%73.59) normal seviyede bulunmuştur. Her iki immunoglobulin birden kadınların sadece %0.5'inde görülmüştür. Tek başına AKA IgG %11.79, tek başına AKA IgM %14.04 oranında bulunmuştur. Bu çalışma, AKA'nın tekrarlayan fetal kayıpların ana nedenlerinden biri olduğunu ve doğru teşhis edilip yeterli seviyede tedavi edildiği sürece çok sayıda gebeliğin kurtarılabilceği fikrini elde etmiştir (81).

Out ve ark. yaptıkları bir araştırmada, 102 hastada ELISA ile AKA'ları %21 olarak bulmuşlardır. AKA pozitif saptanan 13 hasta IgM izotipinde saptanmıştır. Ayrıca AKA pozitif saptanan hastalar ANA ve antiDNA açısından da taranmıştır. ANA pozitifliği %9 (1/40 ve üzeri) saptanmıştır. Hastanın birinde ise antiDNA pozitifliğine rastlanılmıştır (68). Bu çalışmada ise antiDNA pozitifliğine hiç rastlanılmamıştır. Yapılan bir araştırmada, 103 hasta grubunda AKA ve ANA çalışılmış, AKA IgG ve IgM birlikte %3.8 hastada pozitif bulunmuştur. Hastaların %13.6'sında ANA pozitifliği rastlanmıştır. Sonuçta ANA ile AKA arasında yüksek derecede korelasyonun olduğu sonucuna varılmıştır (82).

Alper ve ark. 1999 yılında tekrarlayan düşük geçirmiş 25 kadında ELISA testini kullanarak yaptıkları bir çalışmada AKA'ları %32 olarak saptamışlardır (83). Gülmezoğlu ve ark. tekrarlayan düşük yapmış 63 kişilik hasta grubunda ELISA tekniği ile AKA'ları %33.3 (21/63) olarak bulmuşlardır. Pozitif saptanan bu hastaların 14'ünde IgG AKA, 13'ünde IgM AKA, 6'sında ise her iki antikor pozitifliğini saptamışlardır. Ayrıca %6.3 oranında VDRL pozitifliği de bulunmuştur (84).

Ordı ve ark. tekrarlayan düşük yapmış 7 hastada VDRL, ANA, antiDNA, AKA'ları araştıran bir çalışma yapmıştır. Hastaların 2'sinde ayrıca SLE mevcut bulunmuştur. Bu hastaların 4'ünde VDRL saptanmıştır. Ancak VDRL pozitif bu 4 hastanın 2'sinde SLE saptanmıştır. 5'inde ANA pozitifliği bulunmuştur. Bu ANA pozitif 5 hastanın birinde de SLE tespit edilmiştir. AntiDNA ise 7 hastanın sadece ikisinde pozitif bulunmuştur. Bu 2 hastanın da birinde SLE saptanmıştır. AKA IgG, 7 hastanın 4'ünde bulunmuştur. AKA IgM ise sadece bir hastada tespit edilmiştir. Onda da SLE bulunmuştur (85). Bu çalışmada ANA, antiDNA, VDRL birlikteliğinin sıklığı görülmektedir.

Sifiliz testinde kullanılan sifiliz antijeni kardiyolipin içerdiği için VDRL testi AFAS'da pozitif saptanmaktadır. AntiDNA'da, hücrenin içindeki genetik yapılara karşı oluşmuş otoantikolar araştırılmaktadır. ANA'da ise nükleoplazmadaki antijenlerle reaksiyona giren otoantikolar sözkonusu olduğu için AFAS'da birliktelikleri araştırılmalıdır.

Kumar ve ark.'nın 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, ELISA ile 150 kişilik hasta grubunda beta2-glikoprotein I bağlı AKA antikorlarını %40.24, VDRL'yi ise %2.34 olarak saptamışlardır (86). Literatür verileri, sifiliz izlem sonuçlarının nonspesifik bir antijene karşı antikorlar için pozitif ve spesifik bir antijene karşı olan antikorlar için negatif olma durumunun, muhtemel bir antifosfolipid sendromu için bir işaret olarak düşünülmesi gerektiğini ifade etmektedirler (87). Bu çalışmada ise %9.2 VDRL pozitifliği bulunmuştur.

Senegal’de tekrarlayan düşük öyküsüne sahip kadınlarda antifosfolipidlerin önemi vurgulanmaktadır. Üreme dönemlerinde olup en az iki spontan düşüğü bulunan 96 kadında yapılan araştırmada %21.1’inde AKA varlığı tespit edilmiştir (88). Nielsen ve ark. 2005 yılında 147 hastada ELISA ile yaptıkları bir çalışmada, %41 AKA pozitifliği saptamışlardır. Bunların %32’si AKA IgM iken, %13’ü AKA IgG olarak bulunmuştur. AKA IgM’in AKA IgG’den daha sensitif olduğu ve sonuçta AKA IgM’ in AKA IgG’den daha güçlü olarak tekrarlayan düşükle korele olduğu bulunmuştur (89). Bu çalışmada ise, AKA %75 oranında pozitif bulunmuştur. Bunun da %42.5’i AKA IgM, %23.3’ü AKA IgG antikorlarına ait olarak bulunmuştur. Her iki antikor %9.2 oranında birlikte pozitif bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre IgM tipi AKA antikorları daha yüksek olarak bulunmuştur. Bizim bulduğumuz sonuçlar ile yapılan araştırmalarda bulunan sonuçlar uyum göstermektedir.

Antifosfolipid antikor sendromu ile IgA ilişkisi arada sırada da olsa gözlenmektedir. Yapılan araştırmalarda, nedeni bilinmeyen tekrarlayan düşükle IgA AKA ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (90). Yapılan çalışmalarda, primer veya sekonder AFAS’lı hastalarda IgA AKA tek başına pozitif bulunmamıştır (91).

Uluslararası konsensus raporu tarafından, IgA AKA anlamlı olarak görülmemiştir (92). İzole sadece IgA antikorları için, eğer varsa, klinik anlamlılık belirsizdir ve uyarı ile yorumlanmalıdır (93). Sıklıkla ölçülmesine rağmen insidans riski veya tekrarlayan düşüğün IgA AKA ile birlikteliği kesin değildir. Bizim yaptığımız çalışmada AKA IgA pozitifliğine rastlanmadı. Tespit ettiğimiz sonuç literatür ile uyum göstermektedir.

Branch ve ark. 1997 yılında yaptıkları bir araştırmada, hastaların 26/147’sinin kardiyolipin pozitif antikorları bulunduğunu 13/147’sinin (%8.8) kardiyolipin’den başka fosfolipidlere karşı bağlanma gösterdiğini bulmuşlardır (94). Daha büyük bir çalışmada, tekrarlayan düşük geçirmiş 866 kadın arasında APA’nın prevalansı araştırılmıştır. Bu popülasyonda, kadınların %17’sinin

kardiyolipin antikor pozitifliğinin olduğu, %10'unun kardiyolipinden başka antikorları olduğu bulunmuştur (95).

Yapılan araştırmalarda tekrarlayan düşüklerde antiannexin V ve antibeta2-glikoprotein I antikorlarının rolü henüz belirlenememiştir. Antiannexin V ve antibeta2-glikoprotein I antikorlarının yetersiz fetal sirkülasyon, değişen plasentasyon ve apoptozun olası indüksiyonuna benzeyen protrombotik bir durumun presipitasyonunu içerdiği varsayılmasına rağmen bu antikorların rolü kesin olarak belgelenememiştir (96). Trofoblasta bağlanan beta2-glikoprotein'e bağlı antikorların varlığı defektif plasentasyon ile sonuçlanan trofoblastik hücre mekanizmasıyla kesişebilir denmektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar göstermiştir ki, antiannexin V (%50.8) ve daha az sıklıkla antibeta2-glikoprotein I (%10) antikorları tekrarlayan düşüğü olan kadınlarda yükselmiştir. Elde ettiğimiz bulgulardan özellikle antiannexin V antikorları olmak üzere, antibeta2-glikoprotein I antikorlarının da tekrarlayan düşüklerde rolü olduğu sonucu çıkarılabilir.

Trombofilinin değerlendirilmesinde AKA testine ilave olarak antiprotrombin ve anti β 2-GPI antikorlarına da bakılmalıdır. Buna rağmen birçok çalışma, trombofilinin değerlendirilmesinde antiprotrombin ve anti β 2-GPI antikorları testleri kullanımının sınırlı olduğunu içermektedir (97).

Yapılan çalışmalarda, beta2-glikoprotein'in, trombotik komplikasyonlar ve ölümcül morbidite ile ilişkili bulunan antifosfolipid antikorlarının gelişiminde yer alan bir fosfolipid bağlayıcı protein olduğu ve antikardiyolipin deneylerinden daha iyi düzeyde bir korelasyona sahip olduğu düşünülmektedir (98). Nash ve ark. yaptığı bir çalışmada, anti β 2-GPI %25, AKA %26.04 olarak saptanmıştır (99).

Ulcova ve ark. 2005 yılında tekrarlayan düşük yapmış 627 kadında ELISA ile yaptıkları bir çalışmada AKA, anti-PS, anti β 2-GPI antifosfolipid antikorlarının IgG, Ig A, ve IgM izotiplerini araştırmışlardır. AKA IgG %15.95, AKA IgM %10.53, anti-PS IgM %0.80, anti-PS IgG %46.57, anti β 2-GPI IgA %15.95,

antiβ2-GPI Ig G %0.48 olarak bulunmuştur (100). Bu sonuçlardan antiβ2-GPI IgA'nın tekrarlayan düşüklerle korelasyonunun olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmadaki amaçlardan biri de IgA sıklığının tekrarlayan düşük ile birlikteliğinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada antiβ2-GPI IgA antikoru %5.0 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar tekrarlayan düşük ile IgA birlikteliğine rastlanılabildiğini göstermektedir.

Antikardiyolipin ve antiβ2-GPI arasında bir korelasyon olduğu araştırmalarda gösterilmiştir. Antikardiyolipin antikoru anyonik fosfolipidlere bağlı plazma proteinlerini hedeflediğinden, ki bunlara beta2-glikoprotein I dahildir (101), antiβ2-GPI'in tekrarlayan düşük ile birlikteliği AKA pozitif hastalarda yükseldiğinden AKA varlığına bağlıdır (102). Yapılan bir araştırmada, tekrarlayan düşüklerde kardiyolipin ve beta2-glikoprotein I seviyesi ölçülmüş ve beta2-glikoprotein I bağımlı antikardiyolipin antikoru %7.5 saptanmıştır. Beta2-glikoprotein I, antikardiyolipin antikoru bağlanabilmesini geliştirip artırıyor gibi görünse de, beta2-glikoprotein I tek başına bu hastalarda %4.7 oranında pozitif olarak saptanmıştır (103). Maejima ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, tekrarlayan düşük geçirmiş kadınlarda, beta2-glikoprotein I bağlı AKA IgG %2.8 olarak bulunmuştur (104).

Araştırmalar göstermiştir ki, AKA antikoru serum kofaktörü olan beta2-glikoprotein I varlığında kardiyolipin ile reaksiyona girmektedir. Beta2-glikoprotein I, AKA antikoru bağlanmasını arttırmaktadır. Bu çalışmada da, beta2-glikoprotein I'e karşı oluşan antikoru ile kardiyolipin korelasyonu görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada, antiβ2-GPI IgG ve AKA IgG birlikteliği %10.7 olarak pozitif bulunmuştur. Antiβ2-GPI IgM ve AKA IgM birlikteliği ise %3.9 olarak pozitif bulunmuştur. Bu çalışma sonuçları AKA ile antiβ2-GPI birlikteliğini göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Pereira ve ark. 2003 yılında tekrarlayan düşük yapmış 28 hasta grubunda ELISA ile AKA ve anti β 2-GPI IgG, IgM, IgA antikorlarını araştırmıştır. Toplamda antifosfolipid antikorlarını %32 olarak bulmuşlardır. AKA %32, bunların %7'si IgG AKA, %27'si IgM AKA, anti β 2-GPI %29, bunların da %25'i IgG anti β 2-GPI, %4'ü IgM anti β 2-GPI olarak saptanmıştır. AKA IgA %21 olarak saptanırken (bunlarda da %6 IgM, ve/veya IgG pozitifliği mevcut), IgA anti β 2-GPI bir hastada mevcut bulunmuştur. Bu alışmada AKA IgA'nın AKA IgG ve /veya AKA IgM ile birlikteliğinin gebelik morbiditesi ile yüksek derecede ilişkili olduğu, ancak IgA anti β 2-GPI'in gebelik morbiditesinde kullanılabilişliğinin faydalı olmadığı görülmüştür (105). IgA antifosfolipid antikor tipinin tekrarlayan düşüklerle ilişkisi belirsiz kalmıştır.

Richard ve ark.'nın 2001 yılında 133 tekrarlayan düşük yapmış hasta grubuna ELISA ile yaptıkları bir çalışmada, IgA anti β 2-GPI %44, IgA AKA %11, IgG anti β 2-GPI %2, IgG AKA %2, Ig M anti β 2-GPI %13, IgM AKA %2 olarak bulunmuştur (106). Bu sonuçlar göstermiştir ki, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda antikardiyolipin IgA ve anti β 2-GPI IgA güçlü olarak ilişkili bulunmuştur.

Antiprotrombin antikorlar, protrombik özellikleri olan antikorlar olarak bilinmektedir. Ancak, bu sonuç tüm çalışmalarla desteklenmemektedir. Hatta bu antikorların ilgisiz olduğu (107) veya klinik olarak ilişkili antikorlar olduğu tartışılabilir (108). Bu zıt sonuçların nedenleri, normal sağlıklı populusyondaki yüksek antiprotrombin antikorların varlığı ve bu antikorları tespit edebilmek için denemelerin nasıl gerçekleştirilmesi üzerine hiçbir uluslararası konsensus olmamasıdır (109).

Ulcova ve ark. 2005 yılında yaptığı bir araştırmada, 156 tekrarlayan düşük yapmış kadınlarda, antiprotrombin antikorlarını %12, antiannexin antikorlarını %13.5 olarak saptamışlardır (110). Von Landenberg ve ark.'nın 2003 yılında 170 hasta grubunda ELISA ile yaptıkları bir araştırmada, antiprotrombin IgG %61.7, antiprotrombin IgM %57.6, antiprotrombin IgA %7 olarak bulunmuştur. Ayrıca

ANA pozitifliği % 66.6 olarak bulunmuştur (111). Bu çalışmada ANA oranı %83.3 olarak tespit edilmiştir. Sabatini ve ark.'nın 2007 yılında ELISA ile 100 hasta grubunda antiprotrombin antikolarını araştırmışlardır. Antiprotrombin IgG %59, IgM %35, IgA %10 olarak bulunmuştur (112). Protrombine karşı olan antikolar antifosfolipid sendromla ilişkilendirilmektedir.

Donohoe ve ark.'nın 2001 yılında yaptığı bir araştırmada, ELISA ile AKA IgG %71, AKA IgM %43 ve anti β 2-GPI IgG ve IgM %52 ve %39 olarak bulunmuştur. Ayrıca antiprotrombin IgG'yi %27, IgM'i %61 olarak saptamışlardır (110). Başka raporlarda; AKA ve anti β 2-GPI tromboz ile ilişkili bulunmuştur. Donohoe ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada, antiprotrombin IgG'in düşüklerle ilişkisi belirsiz kalmıştır. Antiprotrombin IgM ise düşük veya tromboz ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan araştırmada antiprotrombin IgG değil antiprotrombin IgM tromboz ve fetal kayıpla ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada antiprotrombin antikoları %25 oranında pozitif olarak bulunmuştur. Antiprotrombin IgG %3.3, antiprotrombin IgM %17.5, antiprotrombin IgA ise %3.3 oranında pozitif olarak tespit edilmiştir Bu sonuçlar, antiprotrombin antikolarının tekrarlayan düşük ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Beta2-glikoprotein I ve protrombin proteinleri, çok yoğun çalışmalarda klinik ile ilişkili bulunmuştur (113).

Yapılan araştırmalarda antiannexin V antikoları tekrarlayan düşük geçirmiş hastalarda önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (114). Tekrarlayan düşük, endotel hücre aktivasyonu ve antiannexin V ile hızlanan plasental tromboz ile kısmen açıklanabilirken, bu tüm düşükler için geçerli değildir. Annexin V, kan koagülasyonunun bir inhibitörü gibi davrandığından, buna karşı oluşan antikolar bir prokoagulan işlev görebilirler. Bu durum, annexin V verilmesinin trombus oluşumunu inhibe ettiği (115) ve antiannexin V verilmesinin plasental tromboz, nekroz ve fetüsün kaybına yol açtığı (116) bulguları ile desteklenmiştir. Annexin V protrombin aktivasyonunu inhibe eder ve normal arteriyel ve venöz kan akım

şartlarında trombus oluşumunu engelleme becerisine sahiptir. Annexin V'e karşı olan antikolar tekrarlayan düşüklerle ilişkilidir. Bu antikoların yıkıcı bir role sahip olmasından ve annexin V işlevini bozduğundan şüphelenilmektedir. Bu yüzden fetal kayıp, arteryel tromboz ile ilişkilendirilmiştir (117).

Mekanik olarak, antiannexin V antikolarının antitrombotik kalkanı bozabildiği veya tehlikeye atabildiği, böylece üreme hatasına yol açtığı şeklinde bir hipotez kurulmuştur. Ayrıca, trofoblast apoptozunu indükleyerek ve trofoblast gonodotropin sekresyonunu önemli ölçüde azaltarak, antiannexin V antikorunun defektif plasentasyonu tetiklediği bulunmuştur (118).

Bizzaro ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada ELISA ile 1038 hasta incelemiş, bunların %25'inde antiannexin V IgG, %27.5 oranında antiannexin V IgM saptamışlardır (119). Bu çalışmada, %50.8 oranında antiannexin V antikoları pozitif tespit edilmiştir. Bunların %40.0'ı antiannexin IgM, %6.7'si IgG antikolarına ait olarak bulunmuştur. AKA'lardan sonra en yüksek pozitif orana antiannexin V antikolarında rastlanmıştır. Bizim sonuçlar literatür ile uyumlu olarak, antiannexin V yüksekliği ile tekrarlayan düşük arasındaki sıkı ilişkiyi göstermektedir.

Jacob ve ark. 2006 yılında 70 tekrarlayan düşükklü hastada ELISA ile yaptıkları çalışmada, Annexin A5 seviyesini %41 olarak pozitif bulmuşlardır. (120). Bu çalışmada da yüksek oranda antiannexin V antikolarına rastlanmıştır (%50.8). Sonuçlarımız literatür ile uyum göstermektedir. Sonal ve ark. 2007 yılında 430 hastada ELISA ile annexin V, antiβ2-GPI ve AKA IgG ve IgM'i araştırmıştır. AKA %27.9 (IgM %16, IgG %19.7), antiβ2-GPI %12.2 (IgM %5.6, IgG %10.6), antiannexin V %14.6 (IgG %6.4, IgM %9.8) olarak bulunmuştur (121).

Tekrarlayan düşüklerin tanısında, beta2-glikoprotein I, protrombin, annexin V gibi fosfolipidlere bağlı plazma proteinleri önem taşımaktadır. Bizzaro ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, tekrarlayan düşük geçiren 77 hastanın serum

örneğinde ELISA tekniği ile fosfolipidler ve fosfolipidlere bağlı plazma proteinlerini araştırmışlardır. IgG ve IgM AKA, antifosfolipidler (anyonik fosfolipidlerin miksi: kardiyolipin, fosfotidilserin, fosfotidil inozitol ve fosfotidik asit), antiβ2-GPI, antiprotrombin ve IgG antiannexin V antikoru incelenmiştir. Testler, ELISA (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) ile çalışılmış ve sonuçta %6 AKA pozitif IgM/IgG, %12 APA pozitif IgG/IgM, %6 antiβ2-GPI pozitif IgM/IgG, %16 antiprotrombin pozitif IgM/IgG, %17 antiannexin V pozitif IgG saptamışlardır (39).

Blank ve ark. yaptığı bir çalışmada, anti-PS antikoru gebelere pasif yolla infüze etmiş, %40 oranında artan fetal rezorpsiyon oranları ve daha düşük plasental ve fetüs ağırlıkları tespit etmişlerdir. Ayrıca anti-PS antikoru plasentada gözlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, anti-PS antikoru patojenik rolüne işaret etmekte ve tekrarlayan düşük geçirmiş hastaların serumlarında anti-PS antikoru için inceleme yapmanın önemini vurgulamıştır (122). Sugi ve ark. 1999 yılında ELISA ile yaptıkları bir çalışmada, anti-PS IgM ve IgG antikoru %4.3 ve %0.7 olarak bulmuşlardır (123). Kowalik ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, %11.4 AKA pozitifliği rastlarken, %20 anti-PS antikoru pozitif saptamışlardır (124). Bu çalışmada anti-PS antikoru %3.3 oranında pozitif bulunmuştur. Bu pozitif sonuçların hepsi IgM tipi anti-PS antikoru olarak tespit edilmiştir. IgG anti-PS antikoru ise hiç rastlanmamıştır. Ayrıca pozitif anti-PS antikoru hepsi antiannexin IgM birlikteliği ile beraber saptanmıştır (%8.3). Elde ettiğimiz sonuçlar tekrarlayan düşük ile antifosfotidilserin antikoru arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Araştırma bulguları birbirleriyle çatışabilir. Bunun sebebi, antijenik substrat kompozisyonu (fosfolipidlere bağlı plazma proteinleri veya tek başına fosfolipid kullanımı), kullanılan metod farklılıkları (kalibrasyon, cutof seviyesi) olabilir.

Laboratuvarlar arasında bir standardizasyonun olmaması doktorların AFAS'lı ve düşük riski taşıyan hastaları tanımasını zorlaştırmaktadır (93).

Böylece, uluslararası araştırmacılarından oluşan bir grup, AFAS'ın teşhisi için klinik ve laboratuvar kriterleri oluşturmuşlardır (92).

Sonuçlar gösteriyor ki; tekrarlayan düşük yapmış kadınlarda antikardiyolipin, antiannexin V ve antiprotrombin pozitifliğinin sıklığı fazladır. Antifosfolipid antikorları arasında bulunan AKA, antiannexinV ve antiprotrombin AFAS ile özellikle ilgilidir.

Elde edilen veriler AKA, antiannexin V ve antiprotrombinin AFAS ile daha uyumlu antikorlar olabileceğini düşündürmektedir. Yaptığımız çalışma bu antikorların klinik semptomlarla daha iyi korelasyon gösterdiğini desteklemektedir.

Bu çalışmada, IgA izotipleri ile çalışılan testlerin, diğer izotip antikorlardan daha az iyi olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmaların sonucu da, IgA antikorlarının AFAS tanısında önemli rol oynamadığı yönündedir. İzole IgA antikorları için klinik anlamlılık belirsizdir.

Sonuç olarak bu çalışma kardiyolipin, annexin V ve protrombin antikorlarının AFAS için yüksek oranda uygun tanısal belirteçler olduğunu göstermektedir. Azalan oranda ise antiβ2-GPI ve anti-PS antikorlarının AFAS ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara istinaden bu testlerin rutin olması gerekliliği önerilmektedir.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Fosfolipidleri hedefleyen antikolar (antikardiyolipin ve antifosfolipidlerin) ve fosfolipidlere bağlanan proteinlerin (antibeta2-glikoproteinI, antiannexin V, antiprotrombin) üretimi tekrarlayan düşükler için risk faktörleridir. Antifosfolipid antikor sendromu, vasküler tromboz, tekrarlayan düşükler ve APA varlığı ile karakterize otoimmün bir bozukluktur. Bu nedenle tekrarlayan düşüklerde APA'ların araştırılması, tanıya daha erken ulaşmayı sağlayacaktır. Ayrıca erken tanıya istinaden hastanın erken tedavisi ile düşük yapması da engellenecektir.

Antifosfolipid antikor sendrom'lu hastalarda VDRL sifiliz testlerinin yalancı pozitifliği, ANA ve antiDNA pozitifliği de mevcuttur. Tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda bu parametrelere de bakılması tanıyı destekleyecektir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ve önerileri, maddeler halinde aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür.

1. Tekrarlayan düşük geçirmiş kadınlarda APA'lardan biri olan AKA'nın araştırılması için yaptığımız testlerde, kardiyolipinlere karşı gelişen bu antikoların APA'lar içindeki en önemli antikor olduğu söylenebilir. AKA'nın en önemli APA olması nedeniyle, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda rutin olarak istenmesi önerilmektedir. AKA araştırılması, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda AFAS'a karşı erken tanı ve tedavi yaklaşımını en kısa zamanda belirlemede yol gösterici olabilir.

2. Antiannexin V, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda ikinci sırada yüksek bulunan antikordur. Plasental antikoagulan olarak da bilinen annexin V, yüzeydeki fosfolipidler üzerinde kümeler oluşturup, fosfolipid yüzey koruyucu görev oluşturur. Bu nedenle antiannexin V antikoları, AFAS'da risk oluşturur. Bu antikoların rutin olarak araştırılması, tekrarlayan düşüklerde erken tanı ve tedavide yol gösterici olacağı kanısına varılmıştır.

3. Azalan sırayla antiprotrombin, anti β 2-GPI ve anti-PS antikoru tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda pozitif saptanmıştır. AFAS’da bu antikoru da rol aldığı kanısına varılmıştır. Tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda bu antikoru da araştırılmasının tanı ve tedavide hastaya yardımcı olabileceği kanısındayız.

4. Bu çalışmaya dahil edilen APA’lar IgG, IgM ve IgA açısından değerlendirilmiştir. Literatür bilgileri genelde IgG ve IgM antikorularının önemi üzerinde durmaktadır. IgA üzerine yapılan çalışmaların bir kısmı belirsiz kalmış ve daha ileri çalışmaların yol gösterici olacağı üzerinde durmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar IgA’nın da AFAS’da yol gösterebileceğini göstermiştir.

5. VDRL testi, ANA, antiDNA pozitiflikleri AFAS ile birliktelik göstermektedir. Bu çalışmada, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda bu testlerin pozitifliklerine rastlanmıştır. Bu testlerin tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda tanı ve tedavide destekleyici olacağının kanısına varılmıştır.

VII. ÖZET

Antifosfolipid antikor sendromu (AFAS), tekrarlayan gebelik kaybı ile seyreden ve genel popülasyonda sıklıkla ortaya çıkan bir durumdur. Antifosfolipid antikor sendrom'lu bireyleri tanımlamak için en önemli yol serolojidir. Bu yüzden, hamilelik komplikasyonları bulunan hastanın kanında antifosfolipid antikor (APA) saptanması, antifosfolipid antikor sendromu'nun teşhisi için esas adımdır.

Bu çalışmada tekrarlayan düşük geçiren 120 gebe kadına ait serum örnekleri Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanılarak, antikardiyolipin (AKA), antibeta2-glikoprotein I (anti β 2-GPI), antifosfolipidlerin (anti-PS), antiannexin, antiprotrombin antikorları IgG, IgM, IgA tipleri açısından araştırılmıştır. Ayrıca hasta serumlarında Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) sifiliz testi, antinükleer antikor (ANA) ve antiDNA parametreleri de çalışılmıştır.

Pozitif sonuç veren hastalarda en sık yükselen antikor tipi %75 oranında AKA olarak bulunmuştur. Bunu %50.8 oranında antiannexin V antikorları, %25 antiprotrombin, %10 anti β 2-GPI ve %3.3 anti-PS antikorları takip etmiştir. Yükselen antifosfolipid antikorlarından özellikle izole IgM tipi, izole IgG veya IgA antikorlarından daha yüksek bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada fosfolipid bağlayıcı proteinler olan anti β 2-GPI, antiprotrombin ve antiannexin'in birliktelikleride görülmüştür. Anti β 2-GPI IgG ile AKA IgG %10.7 oranında birlikte, anti β 2-GPI IgM ile AKA IgM %3.9 oranında birlikte pozitif, antiannexin V IgM ile anti-PS IgM %8.3 oranında korele bulunmuştur. Ayrıca %19.0 oranında anti-PS IgM ile antiprotrombin IgM korele bulunmuştur. Hastalarda %83.3 oranında ANA pozitifliği, %9.2 VDRL pozitifliğine rastlanmıştır. Ancak antiDNA pozitifliğine rastlanmamıştır.

Bu bulgulara göre, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda AFAS'ın tanısında antifosfolipid antikorlarının araştırılmasının önemi açıktır. Erken tanı ve tedavi, tekrarlayan düşük yapan kadınlara bebek sahibi olabilme şansı vermektedir.

Tekrarlayan gebelik kaybı, aile için üzüntü verici bir durum olmakla birlikte etyolojisinin bilinmemesi hekimler açısından da önemli bir konudur. Ayrıca tanı ve tedavisinin sınırlı olması nedeniyle de önemlidir. Tüm bu nedenlerle serumda APA aranmasının, bu tip durumların tanısında önemi büyüktür.

Sonuç olarak, tekrarlayan düşük geçiren kadınlarda AFAS'ın tanısı için serumda APA'ların rutinde bakılması gerektiğini düşünmekteyiz.

VIII. SUMMARY

Antiphospholipid antibody syndrome is a situation that courses as recurrent pregnancy loss and comes out frequently in general population. The most important way to detect individuals with antiphospholipid antibody syndrome is serology. For this reason detection of APA (antiphospholipid antibody) in blood of patients with complicated pregnancy, is the main step for the diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome.

In our study, serum samples of 120 pregnant women with recurrent abortus were investigated in aspect of anticardiolipin antibodies, anti β 2-GPI (antibeta-2-glycoprotein I), anti-PS (antiphosphatidylserine), anti-annexin V, anti-prothrombin IgG, IgM, IgA by using ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method. In addition VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) syphilis test, ANA (Antinuclear antibody) and antiDNA parameters were also performed in patients' sera.

The most increasing antibody type was anticardiolipin antibodies with ratio 75% in patients with positive result. Antiannexin V antibody with ratio 50.8%, antiprothrombin antibody with ratio 25%, anti β 2-GPI with ratio 10% and antiPS antibody with ratio 3.3% were following it. Especially solely IgM type was found more higher than IgG or IgA antibodies from increasing antiphospholipid antibodies. In our study, associations of anti β 2-GPI, antiprothrombin and antiannexin, which are phospholipid binding proteins, also were found. It was found that anti β 2-GPI IgM and anticardiolipin antibodies IgM were together with ratio 10.7%, anti β 2-GPI IgM and anticardiolipin antibodies IgM were together with ratio 3.9%, antiannexin V IgM and anti-PS were correlated with ratio 8.3%. Also 83.3% ANA positivity, 9.2% VDRL positivity was encountered in patients. But antiDNA positivity was not seen.

According to these findings, the importance of investigating antiphospholipid antibodies in women with recurrent abortus for diagnosis of antiphospholipid

antibody syndrome, is obvious. Early diagnosis and therapy, gives a chance to have babies in women with recurrent abortus.

Recurrent pregnancy loss, also a distress situation for families, it is an important issue for physicians to be aware its unknown etiology. In addition, it's crucial because of its restricted diagnosis and therapy. All this purpose, searching APA in serum is important for the diagnosis of this entity.

In conclusion, we are considering that for antiphospholipid antibody syndrome diagnosis in women with recurrent abortus, APA in serum samples must be tested in routinely.

IX. KAYNAKLAR

1. Salat-Baroux J. Recurrent spontaneous abortions. *Reprod Nutr Dev* 1998; 28:1555-68.
2. Stirrat GM. Recurrent miscarriage clinical associations, causes and management. *Lancet* 1990;336:728-33.
3. Güven ESG, Güven S, İslamoğlu GA, Demir B, Güralp S. Tekrarlayan gebelik kayıplarında güncel algoritma. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2006;37:117-123.
4. Arnout J, Vermeylen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 2003;1:931-42.
5. De Groot PG, Derksen RHWM. Antiphospholipid antibodies. Update on detection, pathophysiology and treatment. *Curr Opin Haematol* 2004;11:165-9.
6. Kamashta MA. Hughes syndrome. Antiphospholipid syndrome. Springer Verlag. London, 2000;36:214-224.
7. De Groot PG, Derksen RH. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005;3:854-860.
8. Hughes GVR. Thrombosis, abortion, cerebral disease and lupus anticoagulant. *Br Med J* 1983;287:1088-1089.
9. Stone S, Khamashta MA, Poston L. Placentation, antiphospholipid syndrome and pregnancy outcome. *Lupus* 2001;10:67-74.
10. Uthman I, Khamashta H. Ethnic and geographical variation in antiphospholipid (Hughes) syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1671-1676.
11. Hörkkö S, Miller E, Dudl E, Reaven P, Curtiss LK, Zuaifler NJ, Terkeltaub P, Pierangeli SS, Branch DW, Palinski W and Witztum JL. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids: Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996;98:815-825.
12. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, Espiro R, Xiaowei LE, Mao D, Vialpando GG. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody induced fetal loss. *J Exp Med* 2002;195:211-220.
13. Roubey ASR. Autoantibodies to phospholipid binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulants and other 'antiphospholipid' proteins. *Blood* 1994; 84:2854-2867.

14. Vila P, Hernandez MC, Lopez-Fernandez MT, Batlle J. Prevalence, follow up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost* 1994;72:209-213.
15. Haris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth Yaung CG, Loizou S. Anticardiolipin antibodies detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2:1211-1214.
16. Koike T, Matsuura E. Anti-beta2-glycoprotein I antibody specificity and clinical significance. *Lupus* 1996;5:378-80.
17. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize beta2GP1 structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994;179:457-62.
18. Shoenfeld Y, Gharavi A, Koike T. β 2GP1 in the anti phospholipid (Hughes) syndrome-from a cofactor to an autoantigen-from induction to prevention of antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1998;7:503-6.
19. Blank M, George J, Barak V, Tincani A, Koike T, Shoenfeld Y. Oral tolerance to low dose beta 2-glycoprotein-1. immunomodulation of experimental antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 1998;161:5303-12.
20. Galli M, Luciani D, Bertolini G. Anti beta-2-glycoprotein I antibodies, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003;102:2717-2723.
21. Reber G, Tincani A, Sanmarca M, de Moerlose P, Boffo MC. Proposals for the measurement of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies: standardization group of the European forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb haemost* 2004;2:1860-1862.
22. Merrill JT, Zhang HW, Shen C, Butman BT, Jeffries EP, Lahita RG, Myones BL. Enhancement of protein S anticoagulant function by beta2-glycoprotein I, a major target antigen of antiphospholipid antibodies. Beta2-glycoprotein I interferes with binding of protein S to its plasma inhibitor, C4b-binding protein. *Thromb Haemost* 1999;81:748-57.
23. Shi T, Iverson GM, Qi JC, Cockerill KA, Linnik MD, Konecny P, Krilis SA. Beta-2-glycoprotein I bind factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta-2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sc USA* 2004;101:3939-3944.
24. Shi T, Giannakopoulos B, Iverson GM, Keith A, Matthew D and Stewen A. Domain V of beta-2-glycoprotein I binds factor XI/ XIa and cleaved at Lys 317-Thr 318. *J Biol Chem* 2005;280: 907-912.

25. Schousboe I. β_2 : a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985;66:1086-1091.
26. De Laat B, Derksen RH, Urbanus RT and de Groot PG. Ig G antibodies that recognize epitope Gly 40-Arg 43 in domain of beta-2-glycoprotein I cause LAC and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005;105:1540-1547.
27. Matsubayashi H, Sugi T, Arai T, Kondo A, Suzuki T, Izumi S, McIntyre JA, Makino T. Different antiphospholipid antibody specificities are found in association with early repeated pregnancy loss versus recurrent IVF-failure patients. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:323-9.
28. Yodfat O, Blank M, Krause I, Shoenfeld Y. The pathogenic role of anti-phosphatidylserine antibodies. Active immunization with the antibodies leads to the induction of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:14-20.
29. Martin PD, Malkowski MG, Box J, Esmon CT, Edwards BF. New insights into the regulation of the blood clotting cascade derived from the X-ray crystal structure of bovine meizothrombin des F1 in complex with PPACK. *Structure* 1997;5:1681-93.
30. Chukwuocha RU, Hsiao ET, Shaw P, Witztum JL, Chen PP. Isolation, characterization and sequence analysis of five IgG monoclonal anti-beta2-glycoprotein-1 and anti-prothrombin antigen-binding fragments generated by phage display. *J Immunol* 1999;163:4604-11.
31. Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin auto Abs in patients with systemic lupus erythematosus and aPL syndrome. *Lupus* 1999;8:761-6.
32. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999;93:2149-57.
33. Atsumi, T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the anti-phospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis and Rheumatism* 2000;43:1982-1993.
34. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1996;75:536-41.
35. Van Heerde WL, Lap P, Schoormans S, De Groot PG, Reutelingsperger CPM, Vroom TM. Localization of annexin A5 in human tissues. *Annexins* 2004;1:56-62.

36. Rand JH. APL antibody syndrome: new insights on thrombogenic mechanisms. *Am J Med Sci* 1998;316:142-51.
37. Di Simone N, Meroni PL, De Papa N, Roschi E, Caliandro D, De Carolis CS, Khamoshta MA, Atsumi t, Hughes GR, Bolestrieri G, Tinconi A, Casoli p, Caruso a. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonodotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered β 2-glikoprotein I. *Arthritis Rheum* 2000;43:140-150.
38. Matsubayashi H, Arai T, Izumi S, Sugi T, McIntyre JA, Makino T. Anti-annexin V antibodies in patiends with early pregnancy loss or implantation failure. *Fertil Steril* 2001;76:964-969.
39. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D. Prevalence and clinical correlation of antiphospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipin-negative patients with systemic lupus erythematosus and women with unexplained recurrent miscarriages. *Arch. Pathol. Lab. Med* 2005;129:61-68.
40. Nakamura N, Ban T, Yamaji K, Yoneda Y, Wada Y. Lacialization of the apoptosis-inducing activity of lupus anticoagulant in an annexin V-binding antibody subset. *J Clin Invest* 1998;101:1951-9.
41. Matsubayashi H, Arai T, Izumi S, Sugi T, McIntyre JA, Makino T. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss or implantation failure. *Fertil Steril* 2001;76:694-9.
42. Atasu T, Şahmay S. Abortus. In: Atasu T, Şahmay S. eds. *Jinekoloji*. 1. Baskı, İstanbul: Üiversal Dil Hizmetleri ve Yayıncılık AŞ. 1996:518-531.
43. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic anaylsis of 233 missed abortions. Factors involved in the pathogenesis pf developmental defects of early failed pregnancies, *Hum Reprod* 2003;18:1724-32.
44. Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1996;2:118-136.
45. Stirrat GM. Recurrent miscarriage clinical associations, causes and management. *Lancet* 1990;336:728-33.
46. Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Opstet Gynecol* 2005;17:591-7.
47. Asherson R, Shoenfeld Y. The role of infectionin the pathogenesis of catastrophic antiphospholipid syndrome molecular mimicry. *J Rheumatol* 2000;27:12-4.

48. Rai R, Shlebak A, Cohen H, Baskos M, Holmes Z, Merriott K, Regan L. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2001;16:961-5.
49. Hague MW. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:459-469.
50. Bick RL. Recurrent miscarriage syndrome and infertility caused by blood coagulation protein or platelet defects. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:1117-31.
51. Clark P, Brennan J, Conkie JA. Activated protein C sensitivity, Protein C, Protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1998;79:1166-1170.
52. Kılıçturgay K. Kan Hücrelerinin Gelişimi. *İmmünoloji. Nobel & Güneş Kitabevi, İstanbul* 2003;15-52.
53. Ovalı E. Apoptozis. In :Ustaçelebi Ş. eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara* 1999;195-203.
54. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shameli E. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;3:713-18.
55. Sernee MF, Ploegh HL, Schust Dİ. Why certain antibodies cross-react with HLA-A and HLA-G epitope mopping of two common MHC class I reagents. *Mol Immunol* 1998;35:177-188.
56. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003;24:242-248.
57. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004;112:38-43.
58. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004;10:347-353.
59. Sargent IL, Wilkins T, Redman CW. Maternal immune responses to the fetus in early pregnancy and recurrent miscarriage. *Lancet* 1994;2:1099-1104.
60. Esplin MS. Management of antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44:20-28.
61. Lockshin MD, Sammaritano LR, Schwartzman S. Validation of the sappartiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:440-443.

62. Vianna JL, Khamostha MA, Ordi-Ros J. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients. *Am J Med* 1994;96:3-9.
63. Malm J, Lavrell M, Nilsson IM, Dahlböck B. Thromboembolic disease critical evaluation of laboratory investigation. *Throm Haemost* 1992;68:7-13.
64. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and the lung. *J Rheumatol* 1995;22:62-66.
65. Frances C, Niang S, Laffitte E, Pelletier F, Costedoat N, Piette JC. Dermatologic manifestations of the antiphospholipid syndrome: two hundred consecutive cases. *Arthritis Rheum* 2005;52:1785-1793.
66. Diogenes MJ, Diogenes PC, De Morais Carnerio RM. Cutaneous manifestations associated with antiphospholipid antibodies. *Int J Dermatol* 2004;43:623-627.
67. Bociolone L, Meromi P, Parazzini F, Tincani A, Radici E, Tarantini M, Rossi E, Bianchi C, Mezzanotte C, D'Angelo A. Antiphospholipid antibodies and risk of intrauterine late fetal death. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994;73:389-392.
68. Out HJ, Bruinse HW, Christians GCML. Prevalence of antiphospholipid antibodies in patients with fetal loss. *Ann Rheum Dis* 1991;50:553-557.
69. Lima F, Khamashia MA, Buchanan NMN, Kerslake S, Hunt DJ, Hughes GR. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:131-136.
70. Yasuda M, Takalcuwa K, Takunago A, Tanaka K. Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1995;86:555-559.
71. Alarcon-Segovia D, Perez-Vazquez ME, Villa AR. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome with in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1992;21:275-286.
72. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Haris EN, Hughes GR, Triplett DA, Klamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
73. Triolo G, Ferrante A, Ciccia F. Randomized study of subcutaneous low molecular weight heparin plus aspirin versus intravenous immunoglobulin in the treatment of recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:728-731.

74. Deitcher SR, Rodgers GM. Thrombosis and antithrombotic therapy. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Greer JP, Foerster J, Lukens JN, et al (eds), Lippincott Williams Wilkins, 11 edition, Philadelphia 2004;1713-58.
75. Bowles L, Cohen H. Inherited thrombophilias and anticoagulation in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;17:471-89.
76. Erkan D, Merrill JT, Yazici Y, Sammaritano L, Buyon JP, Lockshin MD. High thrombosis rate after fetal loss in antiphospholipid syndrome. Effective prophylaxis with aspirin. *Arthritis Rheum* 2001;44:1466-1467.
77. Pattison NS, Chamley IW, Birdsall M. Does aspirin have a role in improving pregnancy outcome for women with the antiphospholipid syndrome. A randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1008-1012.
78. Aybay C. İmmünolojik Teknikler. In: Ustaçelebi Ş. eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi, Ankara 1999;325-336.
79. Rai RS., Regan L, Clifford K. Antiphospholipid antibodies and β -2 glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum. Reprod.* 1995;10:2001-2005.
80. Franklin RD. and Kutteh WH. Antiphospholipid antibodies (APA) and recurrent pregnancy loss: treating a unique APA positive population. *Human Reproduction* 2002;17:2981-2985.
81. Sheth JJ, Sheth FJ. Study of anticardiolipin antibodies in repeated abortions-an institutional experience. *Indian J Pathol Microbiol.* 2001;44:117-21.
82. Bahar AM, Alkarmi T, Kamel AS, Sljivic V. Anticardiolipin and antinuclear antibodies in patients with unexplained recurrent abortions. *Ann Saudi Med.* 1993;13:535-40.
83. Alper G, Tavmergen EG, Kabasakal Y, Onat T. Lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in unexplained fetal losses. *Tr. J. Of Medical Sciences* 1999;29:145-150.
84. Gülmezoğlu AM, Ergüven S, Büyükkagıncı Ü, Gülmezoğlu E, Durmuş Z. Anticardiolipin antibodies in recurrent fetal loss. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 1988;1:143-146.
85. Ordı j, Barounero J, Vılandell M, Jordana R. Fetal loss treatment in patients with antiphospholipid antibodies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1989; 48:798-802.
86. Kumar KS, Jyothy A, Prakash MS, Rani HS, Reddy PP. Beta2-glycoprotein I dependent anticardiolipin antibodies and lupus a pregnancy loss. *Journal of Postgraduate Medicine* 2002;48:5-10.

87. Zampach P, Vrajova Z. Syphilis screening and the antiphospholipid syndrome. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2007;13:26-7.
88. Thiam D, Toure Fall AO, Moreau JC, Diop S, Diouf A, Fall K, Diadhiou F, Diakhate L. Antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortions at the Aristide Le Dantec University Hospital Center. *Dakar Med.* 2000;45:70-3.
89. Nielsen SH and Christiansen OB. Prognostic impact of anticardiolipin antibodies in women with recurrent miscarriage negative for the lupus anticoagulant. *Human Reproduction* 2005;20:1720-1728.
90. Bahar AM, Kwak JY, Beer AE, Kim JH, Nelson LA, Beamam KD, Gilman-Sachs A. Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in non-pregnant women with unexplained spontaneous recurrent abortions. *J Reprod Immunol* 1993;24:213-222.
91. Marai I, Gilburd B, Blank M, Shoenfeld Y. Anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibody assays as screening for anti-phospholipid syndrome. *Hum Antib* 2003;12:57-62.
92. Wilson WA, Gharavi AE and Piette JC. International classification criteria for antiphospholipid syndrome: synopsis of a post-conference workshop held at the 9th International (Tours) APL Symposium. *Lupus* 2001;10:457-460.
93. Carreras LO, Forastiero RR and Martinuzzo ME. Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome. *J. Autoimmun.* 2000;15:163-172.
94. Branch DW, Silver RM, Pierangeli SS, Van Leewen I. and Haris EN. Antiphospholipid antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet. Gynecol.* 1997;89:549-555.
95. Yetman DL. and Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil. Steril.* 1996;66:540-546.
96. Rand J, Eerden PV, Wu XX, Chazotte C. Defective annexin A5 crystallization: a mechanism for pregnancy losses in the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis Research* 2005;115:77-81.
97. De Groot PG, Horbach DA, Simmelink MJA, Van Oort E, Derksen RHWM. Anti-prothrombin antibodies and their relation with thrombosis and lupus anticoagulants. *Lupus.* 1998;7:S32-S36.
98. Myers B, Gould J. The place of beta 2 glycoprotein 1 in the assessment of antiphospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003;14:1-2.

99. Nash MJ, Camileri RS, Kunka S, Mackie J, Mackin J and Cohen H. The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2004;2:1077-81.
100. Ulcova-Gallova Z, Krauz V, Novakova P, Milichovska L, Micanova Z. *American Journal of Reproductive Immunology* 2005;54:112-117.
101. Marai I, Tincani A, Balestrieri G, Shoenfeld Y. Anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. *Autoimmunity* 2005;38:33-38.
102. Lee RM, Elmen W, Scott JR, Branch DW, Silver RM. Anti-beta-2-glycoprotein I antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, unexplained fetal death, and antiphospholipid syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999;181:642-648.
103. Ozawa N, Makino T, Matsubayashi H, Hosokawa T, Someya K, Nozawa S, Matsuura E. Beta2-GPI-dependent and independent binding of anticardiolipin antibodies in patients with recurrent spontaneous abortions. *J. Clin Lab Anal.* 1994;8:255-9.
104. Maejima M, Fuji T, Okai T, Kozuma S, Shibata Y and Taketani Y. Beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibody in early recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction* 1997;12:2140-2142.
105. Pereira CS, Bertolaccini ML, Escudero-Contreras A, Khamashta MA, Hughes GRV. Value of IgA anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I antibody testing in patients with pregnancy morbidity. *Ann Rheum Dis* 2003;62:540-543.
106. Richard M, Lee MD, Ware Branch MD and Robert M, Silver MD. Immunoglobulin A anti-beta2-glycoprotein I antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:748-53.
107. Simmelink MJA, de Groot PhG, Derksen RHWM. A study on associations between antiprothrombin antibodies, antiplasminogen antibodies and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1:735-9.
108. Zanon E, Saggiorato G, Ramon R, Girolami A, Pagnan A, Prandoni P. Anti-prothrombin antibodies as a potential risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2004;91:255-8.
109. Donohoe S, MacKie IJ, Isenberg D, Machin SJ. Anti-prothrombin antibodies: assay conditions and clinical associations in the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2001;113:544-9.
110. Ulcova-Gallova Z, Mukensnabl P, Hadravská S. Antibodies Against Annexin V and Prothrombin, Their Correlation WITH Other Antibodies in Recurrent Pregnancy Loss. *Journal of Reproduction & Contraception* 2005;16:35-46.

111. Von Landenberg P, Matthias T, Zaech J, Schultz M, Lorber M, Blank M, Shoenfeld Y. Antiprothrombin antibodies are associated with pregnancy loss in patients with the antiphospholipid syndrome. *AJRI* 2003;49:51-56.
112. Sabatini L, Torricelli M, Scaccia V. Increased Plasma Concentrations of Antiprothrombin Antibodies in Women with Recurrent Spontaneous Abortions. *Clinical Chemistry* 2007;53:228-232.
113. Von Landenberg P, Matthias T, Zaech J, Schultz M, Lorber M, Blank M, and Shoenfeld Y. Antiprothrombin antibodies are associated with pregnancy loss in patients with the antiphospholipid syndrome. *Am J. Reprod. Immunol.* 2003; 49:51-56.
114. Matsubayashi H, Arai T, Izumi S, Sugi T, McIntyre JA, Makino T. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss or implantation failures. *Fertility and Sterility* 2001;76:694-699.
115. Van Ryn-McKenna J, Merk H, Muller TH, Buchanan MR, Eisert WG. The effects of heparin and annexin V on fibrin accretion after injury in the jugular veins of rabbits. *Thrombosis and Haemostasis* 1993;69:227-230.
116. Wang X, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR. AnnexinV is critical in the maintenance of murine placental integrity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999;180:1008-1016.
117. Esposito G, Tamby MC, Chanseaud Y, Servettaz A, Guillevin L, Mouthon L. Anti-annexin V antibodies: are they prothrombotic. *Autoimmun Rev.* 2005;4:55-60.
118. Di Simone N, Castellani R, Caliandro D, Caruso A. Monoclonal antiannexin V antibody inhibits trophoblast gonadotropin secretion and induces syncytiotrophoblast apoptosis. *Biology of Reproduction* 2001;65:1766-1770.
119. Bizzaro N, Antico A, Musso M, Platzgummer S, Camogliano L, Tozzoli R, and Villalta D. A prospective study of 1038 pregnancies on the predictive value of anti-annexin V antibodies for fetal loss. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 2005;1050:348-356.
120. Jacop H, Rand MD, Alan A, Arslan MD, Xiao-Xuan Wu MD, Rosemary Wein RN. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006;194:182-8.
121. Sonal V, Shrimati S, Vinita S, Purnima S, Kanjaksha G. A comprehensive screening analysis of antiphospholipid antibodies in Indian women with fetal loss. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2007; 137:136-40.

122. Blank M, Tincani A, Shoenfeld Y. Induction of experimental antiphospholipid syndrome in naive mice with purified IgG antiphosphatidylserine antibodies. *J Rheumatol*. 1994;21:100-4.
123. Sugi T, Katsunuma J, Izumi S, McIntyre JA, Makino T. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil Steril*. 1999;71:1060-5.
124. Kowalik A, Vichnin M, Liu HC, Branch W, and Berkeley A. Mid-follicular anticardiolipin and antiphosphatidylserine antibody titers do not correlate with *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 1997;68:298–304.