

Trombofili ve tanı yöntemleri

Doç. Dr. Serdar Bedii Omay

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı

Trombofili kelime anlamı olarak trombozu sevme (Thrombo-philia) anlamına gelir. Tromboz patogenezinde rol oynayan faktörler ilk kez 1856 yılında Rudolph Virchow tarafından tanımlanmış olup halen günümüzde geçerliliğini korumaktadır. Virchow'un tanımladığı triad şöyledir: Trombüs gelişiminde 3 faktör önemli rol oynar;

- 1- Damar duvarında hasar
- 2- Kan akımında yavaşlama (staz)
- 3- Kanın bileşimindeki değişiklikler

Tromboz gelişimi, kalıtsal ve edinsel birçok faktörün değişik mekanizmalar ile rol oynadığı multifaktöriyel bir olaydır. Bunlar, benden önceki konuşmacı arkadaşlar tarafından ayrıntılı olarak anlatıldı. Arteriyel ve venöz sistemlerde meydana gelen trombüslerin formasyonunun farklı olması da multifaktöriyel bir sürecin varlığına işaretler. Arteriyel sistemde daha çok trombosit fonksiyon bozuklukları ve endotel hasarının rol aldığı, venöz sistemde ise pıhtılaşma sistemine ait bozukluklar ve stazın tromboz gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Bu yazıda kalıtsal ve edinsel trombofilide kullanılan tanı yöntemlerine değinilecektir.

KALITSAL TROMBOFİLİLERDE TANISAL TESTLER

Pıhtılaşma sistemi ile ilgili bilgilerin berraklaşması ile birlikte 20. yüzyılın ikinci yarısında kalıtsal trombofililer de aydınlatılmaya başlanmıştır. İlk kez 1965' de antitrombin eksikliğinin tromboza eğilim yarattığı, 1980'lerde de protein C ve protein S eksikliklerinin tromboza eğilim yarattığının gösterilmesi üzerine kalıtsal trombofililerin %15'ini oluşturan bu 3 neden ortaya konmuştur. 1990'lı yıllarda da APC direncinin ve faktör V Leiden mutasyonunu tanımlanması kalıtsal trombofili nedenlerinin %50'ye yakınında etyolojinin aydınlatılmasına olanak sağlamıştır. Yine geçen yüzyılın son yıllarına doğru hiperhomosisteinemi ve protrombin 20210 allelinin tanımlanması kalıtsal trombofilie olan ilgiyi daha da arttırmıştır. Bütün bu gelişmelere karşın bugün kalıtsal trombofili düşünülen hastaların %45-60'ında tüm incelemelere rağmen nedeni ortaya koymak mümkün olamamaktadır.

Kalıtsal trombofili nedenlerinin büyük bir kısmından pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan doğal mekanizmalardaki bozukluklar sorumludur ve genellikle hiperhomosisteinemi dışındakiler sadece venöz tromboza eğilimi arttırmırlar. Kalıtsal trombofili nedenlerini genetik olarak taşıyan bireylerde tromboz riski artmakla birlikte, yaşamları boyunca hiçbir trombotik atak geçirmemeleri de mümkündür. Bu da tromboz için her zaman tek başına kalıtsal nedenlerin yeterli olmadığını, tromboz gelişiminde için bazı edinsel faktörlerin de katkısının olduğunu akla getirmektedir.

Kalıtsal trombofili tanısı için kullanılan testler uygun seçilmediği takdirde hem zaman, hem maddi kayıba yol açmakta hem de yanıltıcı sonuçlar doğurabilmektedir. Her hastada kalıtsal trombofili aranmaktansa belirli durumlarda akla getirilmesi daha doğrudur. Aşağıda belirtilen durumlarda akla kalıtsal trombofili gelmeli ve bu yönde tanisal testler yapılmalıdır:

- 1- Genç yaşta (40 yaşından önce) oluşup nedeni başka bir şekilde izah edilemeyen tromboembolizm atakları olanlarda
- 2- Atipik bölgelerde tromboz gelişenlerde (örneğin; üst ekstremité venleri, mezenterik ven, portal ven, hepatik ven, serebral sinüslerde).
- 3- Tekrarlayıcı ve gezici tromboemboli saptanan kişilerde
- 4- Ailenin diğer bireylerinde tromboemboli öyküsü olan-

larda

- 5- Warfarine bağlı deri nekrozu öyküsü olanlarda
- 6- Neonatal tromboz (purpura fulminans, yenidoğanda DIC) öyküsü olanlarda.

ANTİTROMBİN EKSİKLİĞİ

İlk aşamada ve tarama testi olarak fonksiyonel testler kullanılmalıdır. Böylece hem tip I hem tip II eksikliği olan hastaları yakalamak mümkün olur. Fonksiyonel testlerde trombin veya FXa gibi AT' e duyarlı bir enzim ile plazma inkübe edilir ve rezidüel enzim miktarı değişik substratlar aracılığı ile (en sık kromojenik, florojenik, esterolitik) ölçülür.

Fonksiyonel testlerde AT aktivitesi %80-120 arasında normal kabul edilir. %70'in altındaki değerler AT eksikliğinin göstergesidir. Edinsel AT eksikliğine yol açabilen durumlar (Tablo 2) ekarte edildiği durumlarda bir de aile üyelerinde AT düzeyinin düşük bulunması kalıtsal AT eksikliği tanısını kuvvetlendirir.

Fonksiyonel test ile eksiklik gösterildiği takdirde immüno- lojik testler kullanılarak antijen miktarı ölçülüp tip I, tip II ayırımı yapılabilir. İmmüno- lojik testlerden en sık kullanılanı radial immünelektroforez ve elektroimmünassay (Laurell elektroimmünassay) yöntemleridir. Bu testlerde ticari kitler kullanılarak AT-antikor kompleksleri oluşturulur ve plazma veya serumdaki AT miktarı tayin edilir.

Tablo 2. Edinsel AT eksikliğine neden olabilen durumlar

Trombozun akut dönemi
Heparin kullanımı
Oral kontraseptif kullanımı
L-Asparajinaz kullanımı
Karaciğer hastalığı
Nefrotik sendrom
Gebelik ve Preeklampsi
Cerrahi girişimler
Dissemine intravasküler koagülasyon

AT eksikliğine yol açan genetik bozukluklar oldukça fazla sayıda olduğundan moleküler araştırmalar oldukça pahalıdır.

PROTEİN C EKSİKLİĞİ

Protein C eksikliğinde de tanıda ilk aşama fonksiyonel testlerdir. Böylece hem tip I hem de tip II PC eksikliği olan hastalar yakalanabilir. Fonksiyon düşük bulunursa tip ayırımı için antijenik miktar ölçülmelidir. Fonksiyonel testlerde protein C yi APC haline getirilir ve ardından APC'nin antikoagulan aktivitesi pıhtılaşma testlerine dayanarak (aPTZ) ölçülür. Fonksiyonel testlerde PC aktivitesi genellikle %70-140 arasında normal kabul edilmektedir. Heterozigot PC eksikliği olanlarda PC aktivitesi %50'den az, homozigot PC eksikliği olanlarda ise %5'den az bulunmaktadır.

Tip ayırımı için ikinci aşamada immüno- lojik testler gelir. Bu testte, hasta plazmasına anti-PC antikorları ilave edip kantitatif ölçüm yapılır. Laurell rocket elektroforezinde poliklonal antikorlar eklenip, elektrik akımı uygulanır ve immüno- presipitasyon arki ile ölçüm yapılır. Ölçüm yapılacak plazmaya monoklonal anti-PC antikorları eklenip bu karışıma kolorimetrik substratı parçalayan enzim içeren sekonder antikor eklenerek plazmadaki PC miktarının ölçümü de yapılabilir ki bu yöntem de kolorimetrik yöntem adını alır. Moleküler genetik araştırmalar, çok sayıda mutasyon tanımlandığı için pahalı bir yöntem olmaktadır.

Edinsel PC eksikliği yapan nedenler tablo 3 de özetlenmiştir.

PROTEİN S EKSİKLİĞİ

Protein S eksikliğinin laboratuvar tanısı oldukça zordur ve bu konuda hala bir standardizasyon yoktur. Her 3 tip PS eksikliğinde de fonksiyonel bozukluk olduğundan aslında tanıda ve tarama testi olarak fonksiyonel testlerin kullanılması önerilmektedir. Ancak fonksiyonel testlerin özgülüğünün düşük olması ve aktive protein C direnci olan kişilerde yanlış sonuç vermesi nedeniyle fonksiyonel testlerin kullanımı kısıtlanmaktadır. Bunun yanı sıra PS nin hem serbest hem de plazma proteinlerine bağlı fraksiyonlarının olması ve C4b-BP miktarının akut faz reaktanı olarak duruma göre artıp azalması da immünolojik testlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Fonksiyonel testler hasta plazmasındaki PS nin dışarıdan eklenen APC nin antikoagülan etkisini arttırmasına dayanır. Bu testlerin yorumunda da görüş birliği olmamasına karşın normalde %70-140 olan PS aktivitesinin %30'un altında olması konjenital eksiklik lehine değerlendirilmektedir. Serbest PS ölçümü için plazmada bağlı kısmın polietilen glikol yardımı ile uzaklaştırılması gerekir. Total PS ölçümü için ise C4b-BP ile bağlı olan PS i ayıran enzimler kullanılır. Her iki ölçüm için de immünolojik yöntemlerden enzyme linked- immünassay veya rocket immünoelektroforezi tercih edilir. Edinsel PS eksikliği yapan nedenler tablo 3 de özetlenmiştir.

Tablo 3. Edinsel PC ve PS eksikliği yapan nedenler:

Tromboz sonrası akut dönem
Karaciğer fonksiyon bozukluğu
DIC
Antifosfolipid sendromu
Oral antikoagülan kullanımı
Gebelikte
Uzun süre hastanede yatan kişilerde

FAKTÖR V LEİDEN MUTASYONU VE APC DİRENCİ

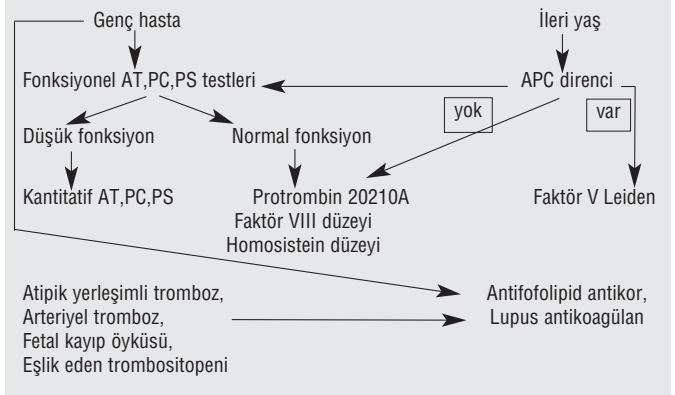
Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ)'na dayalı testler kullanılmaktadır. Normalde aPTZ reaksiyonuna dışarıdan APC eklenmesi FVa ve FVIII'nun parçalanmasını arttırarak pıhtılaşma zamanını uzatır. Ancak APC direnci olan durumlarda bu uzama gerçekleşemez. Hastaya ait aPTZ çalışıldıktan sonra plazmaya APC ilave edilerek test tekrarlanır ve aPTZ+APC/aPTZ oranı elde edilir. Bu oranın belli değerin altında olması APC direncini ifade eder. Bu oran hesaplanırken kullanılan reaktifler ve koagülometre cihazının yaratacağı farklar dikkate alınmalı ve her laboratuvar kendi cut-off değerini saptamalıdır. Bir diğer önemli husus da bu standart APC direnci testinin oral antikoagülan ve heparin kullanımlarında, gebelerde, PS eksikliğinde, lupus antikoagülanı varlığında, FVIII yüksekliğinde ve pıhtılaşma faktör eksiklikleri olanlarda kullanılamayacağıdır. Bu durumda hasta plazmasına 1/5 oranında FV'den yoksun plazma karıştırılarak pıhtılaşma faktörlerinin düzeyinin normalleştirildiği modifiye APC direnci testi kullanılır. Modifiye testin duyarlılığı daha yüksek olduğu için tarama testlerinde kullanılması önerilmektedir.

FV geninde mutasyon bölgesi uygun primerler aracılığı ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yoluyla amplifiye edilir. Elde edilen PCR ürünü uygun enzimlerle kesilir ve mutasyon gösterilir. Ancak ilk aşama APC direncinin araştırılması, ikinci aşama moleküler genetik incelemesidir. Zira FV Leiden mutasyonu olmadığı halde APC direncinin söz konusu olduğu durumlar da vardır.

PROTROMBİN 20210A ALLELİ

Tanı DNA analizi ile konur. Mutasyon bölgesini tanıyan primerler aracılığı ile PCR yöntemi kullanılarak gen amplifikasyonu yapılır ve ürün uygun enzimlerle kesilerek mutasyonun varlığı saptanır. Hastalarda genellikle protrombin zamanı uzundur ve pek çok klinik durumdan etkilenebildiği için tarama amaçlı kullanılamaz.

Tablo 4. Trombofili düşünülen hastada yapılacak laboratuvar testlerinin algoritmi



HİPERHOMOSİSTEİNEMİ

Tanıda ilk aşama serumda açlık homosistein tayinidir. Eritrositler homosistein içerdiği için kanın hızlıca plazması ayrılmalıdır. Normal konsantrasyonu açlıkta 5-15µmol/L'dir. Hiperhomosisteinemiler hafif (15-30 µmol/L), orta (30-100 µmol/L) ve ciddi (>100µmol/L) olan üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Homosistein düzeyi iyon değişim kromatografisi, gaz kromatografisi, yüksek performanslı likid kromatografisi (HPLC) yöntemleri ile elektrokimyasal veya floresan dedektör kullanılarak belirlenir. Kalıtsal defektler için ise Sistasinyon-beta sentaz ve metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimlerini kodlayan genlerde mutasyonları tanımlamak amacıyla PCR kullanılabilir.

EDİNSEL TROMBOFİLİDE TANI YÖNTEMLERİ

Edinsel trombofilinin tanısında kullanılan testlerin seçiminde anamnez büyük ölçüde yönlendirici olmaktadır. Tablo 1b de yer alan hastalıkların çoğunu anamnez, fizik muayene, tam kan sayımı, periferik kan yayması, eritrosit sedimentasyon hızı ve temel biyokimyasal testler ile tanımlamak mümkündür.

ANTİFOSFOLİPİD SENDROMU

AFS tanısında kullanılan testler:

1- Yalancı pozitif sifiliz testleri: VDRL, RPR gibi testlerin reaktiflerinde fosfolipidler bulunduğu için antifosfolipid antikorları bu testlerin pozitif sonuçlanmasına neden olabilir. Bu testlerin duyarlılığı düşük olduğundan rutin taramada ve tanı kriteri olarak kullanılmaz, ancak AFS tanısını destekler.

2- Antikardiolipin antikorları (AKL): Standardizasyonu iyi sağlanmış olan bu test ELİSA yöntemi ile bakılmaktadır. Kardiolipin ile kaplı çukurcuklara hasta serumu eklenerek IgM ve IgG tipi antikorlar saptanabilir. IgA tipi antikorlar da saptanabilmekle beraber bu sendromun kliniği ve etyopatogenezindeki rolü henüz bilinmemektedir. Sonuçlar IgM için MPL, IgG için GPL ünitesi olarak verilir. Sonuçlar yorumlanırken normal kişilerde de bu belli oranda AKL pozitifliği saptanabildiği akla getirilerek toplum taraması ile elde edilmiş normal değerler gözönüne alınmalıdır.

3- Lupus Antikoagülanı (LA): Bir invitro fenomendir. Lupus antikoagülanı aPTZ de uzamaya neden olur. Hastada pıhtılaşma testleri uzun olduğu halde kanamaya eğilim yoktur. Aksine tromboza eğilim sözkonusudur. LA taramasında, aPTZ, kaolin pıhtılaşma zamanı (KPZ), seyreltilmiş Russell's viper venom zamanı (sRVVZ), doku tromboplastini inhibisyon testi (DTİT), tekstarin/ekarin zamanı testleri kullanılabilir.

Sonuç olarak tromboz oluşumu multifaktöriyel bir durum olduğundan bir hastanın trombofili açısından tanınması zahmetli ve pahalı bir işlemdir. Uygun hastanın seçimi, tarama testlerinin zamanına ve sırasına karar vermek, edinsel faktörleri gözönünde bulundurmak tanıya gidişi kolaylaştıracaktır.