

Kömür Madeni İşçilerinde Plazma Antikoagülan Protein Düzeyleri ve Trombin Zamanının Değerlendirilmesi

EVALUATION OF PLASMA ANTICOAGULANT PROTEIN LEVELS AND THROMBIN TIME IN COAL MINERS

Dr.Ahmet GÜREL,^a Dr.Ferah ARMUTCU,^a Dr.Murat ÜNALACAK,^b
Dr.Ali ÖZEREN,^c Dr.Mustafa AYDIN,^c Dr.Nejat DEMİRCAN^b

^aBiyokimya AD, ^bAile Hekimliği AD, ^cKardiyoloji AD, Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, ZONGULDAK

Özet

Amaç: Bu çalışma kömür tozuna maruz kalan işçilerde doğal antikoagülan proteinler olan protein C, protein S ve antitrombin III düzeyleri ile trombin zamanındaki değişiklikleri araştırmak amacı ile planlandı. Kömür tozu fibroblast proliferasyonunu, ekstrasellüler matriks sentezini ve proinflatuar faktörlerin sekresyonunu artırmaktadır. Bu nedenle kömür tozunun etkisi sadece akciğer dokusu ile sınırlı kalmamakta, birçok sistemi de etkilemektedir. Özellikle IL-6 ve TNF- α miktarında artışa neden olması koagülasyon sisteminde değişikliğe neden olabileceğini düşündürmektedir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada kömür madeninde çalışan 34 erkek çalışma grubu ve kömür madeninde çalışmayan 32 erkek kontrol grubu olarak alındı. Her iki grupta alınan kan örneklerinden protein C, protein S ve antitrombin III düzeyleri ve trombin zamanı çalışıldı.

Bulgular: İşçi grubu plazma protein C, protein S ve antitrombin III düzeyi kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunurken trombin zamanı anlamlı derecede yüksekti ($p<0.001$).

Sonuç: Antikoagülan protein seviyelerinin düşük olması nedeni ile maden kömürü işçilerinin hiperkoagülapati ve buna bağlı tromboembolik olaylar gelişimi yönünden risk altında oldukları düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Kömür madencisi, protein C, protein S, antitrombin III, trombin zamanı

T Klin Tıp Bilimleri 2004, 24:125-129

Abstract

Objective: This study was planned to investigate alterations in the anticoagulant proteins; protein C, protein S and antithrombin III levels, as well as in thrombin time in coal miners exposed to coal dust. Coal dust increases fibroblast proliferation, extracellular matrix synthesis and secretion of proinflammatory factors. As such, the effect of coal dust is not restricted to the lungs, and various other organs may also be compromised. In particular, the increase in IL-6 and TNF- α levels seen in patients from this milieu leads to the assumption that coal dust may cause inflammation and other alterations that may have a direct hemodynamic effect upon the circulation.

Material and Methods: In this study, 34 males employed in coal mining were taken as a study cohort. 32 non-coal mining males functioned as a control group. Protein C, protein S and antithrombin III levels, as well as thrombin time were measured in blood samples from both groups.

Results: Protein C, protein S and antithrombin III levels were found to be significantly lower and thrombin time was found to be significantly higher in the study group when compared to those of the control group ($p<0.001$).

Conclusion: Due to low levels of anticoagulant proteins, coal miners manifest and increased risk of hypercoagulopathy and other related thromboembolic complications.

Key Words: Coal miner, protein C, protein S, antithrombin III, thrombin time

T Klin Med Sci 2004, 24:125-129

Kömür tozu inhalasyonu pnömokonyoz, progressif massiv fibrozis, kronik bronşit ve amfizem gibi akciğer hastalıklarına neden olmaktadır. Bu hastalıkların patofizyolojik

mekanizmaları kesin olarak ortaya konulamamakla birlikte; kömür tozunun immum sistemde meydana getirdiği değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Kömür tozunun fibroblast proliferasyonunu, ekstrasellüler matriks sentezini ve proinflatuar faktörlerin sekresyonunu artırdığı bilinmektedir.^{1,2} Kömür tozunun özellikle interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), transforming büyüme faktörü- β gibi önemli sitokinler ile etkileşimi in vivo ve in vitro çalışmalarla ortaya konmuştur.

Geliş Tarihi/Received: 02.09.2003

Kabul Tarihi/Accepted: 31.03.2004

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Ahmet GÜREL
Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,
67600 Kozlu –ZONGULDAK
dragurel@yahoo.com

Copyright © by Türkiye Klinikleri

T Klin J Med Sci 2004, 24

125

Zhang ve arkadaşları³ kömür tozuna maruz kalan insan akciğer epitel hücrelerinde pnömokonyoz gelişiminde çok önemli rol oynayan IL-6 miktarını ve mRNA seviyesini yüksek bulmuşlardır. Kömür madeni işçilerinde T hepler 2 sitokinlerinden IL-6 miktarında artış olduğu Zhai ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir.⁴ Kömür partikülleri ile stimülasyonun TNF- α nın protein salınımı kadar mRNA ifadesinde de artışa neden olduğu,^{5,6} kömür madeni çalışanlarında solubl TNF reseptörleri R55 ve R75' in serum düzeylerinde yükselme olduğu bildirilmiştir.⁷

Protein C, kan pıhtılaşmasının düzenlenmesinde fonksiyon gören glikoprotein yapısında K-vitami bağımlı bir antikoagülan proteindir. Bu protein, trombomoduline trombonin bağlanması ile aktive protein C (APC) ye dönüşür.^{8,9} APC hem aktive olmuş faktör V ve VIII' i inaktive ederek, hem de plazminojen aktivatör inhibitör-1' in aktivasyonunu nötralize ederek antikoagülan etki oluşturur.¹⁰ Protein C antikoagülan etki için kofaktör olarak başka bir K-vitami bağımlı doğal antikoagülan protein olan protein S ye gereksinim duyar. Protein S plazmada serbest ve kompleman düzenleyen proteine, C4b bağlayan protein, bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Bunlardan sadece serbest formu antikoagülan etkiye sahiptir. Protein S' nin antikoagülan etkisi hem APC için kofaktör olarak fonksiyon görmesinden hem de APC' den bağımsız olarak protrombinaz aktivitenin inhibisyonuna neden olup doğrudan aktive faktör V ve X ile etkileşmesinden kaynaklanmaktadır.¹¹⁻¹⁴

Antitrombin III karaciğerde sentezlenen ve koagülasyon yolundaki serin esterazları kovalent bağ yaparak inaktive eden bir proteindir.¹⁵

Bu çalışma; kömür tozunun başta solunum sistemi olmak üzere bir çok sistemde patolojik değişiklikler oluşturması nedeni ile kömür tozuna maruz kalan işçilerde antikoagülan sistem bileşenleri olan protein C, protein S ve antitrombin III' ün plazma düzeyleri ile trombin zamanında (TT) olası değişikliklerin araştırılması amacıyla planlandı.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesin-

de Aile Hekimliği, Kardiyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Çalışma öncesi bilgilendirilen ve onayları alınan: Zonguldak kömür madeni işletmesinde yer altında çalışan 34 işçi (41 ± 3 , yaşlarında) çalışma grubu ve herhangi bir kronik ve metabolik hastalığı olmayan sağlıklı 32 erkek (40 ± 4 , yaşlarında) kontrol grubu olarak kabul edildi. Hastalardan sabah aç karna sitratlı tüpe kan örnekleri alındı ve 2500 g de 15 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı.

Plazma protein C, protein S, antitrombin III seviyesi ve trombin zamanı Dade Behring marka BCT cihazında aynı marka kitler kullanılarak ölçüldü. Protein C ve S düzeylerinin ölçümünde kullanılan kit pıhtı oluşum prensibi ile, Antitrombin III miktarı ölçümünde kullanılan kit ise renk oluşum prensibi ile çalışmaktadır. Antikoagülan protein sonuçları normal değer yüzdesi (%) şeklinde ifade edildi.

İstatistiksel değerlendirme Windows 2000 ortamında paket SPSS (10.0) programında Student t testi kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Grupların plazma protein C ve protein S sonuçlarına ait veriler (Tablo 1) de, antitrombin III ve trombin zamanına ait verilerde (Tablo 2) de verilmiştir. Bu çalışmada plazma protein C, protein S ve antitrombin III düzeyi kömür madeni işçilerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunurken trombin zamanı yüksek bulundu.

Tartışma

Kömür madeni işçilerinde gözlenen düşük antikoagülan protein düzeylerinin patofizyolojik mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte; kömür tozunun neden olduğu artmış plazma TNF- α ve IL-6 seviyelerinin etkili olduğunu düşündürmektedir. Çünkü koagülasyon sistemi ile bu sitokinler arasında güçlü bir etkileşim vardır. Hooper ve arkadaşları,¹⁶ sepsiste sıklıkla gözlenen, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) patogenezinde antikoagülan protein üretimindeki azalmada TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin etkili olduğunu bildirmişlerdir. TNF- α nın DIC' li

Tablo 1. Gruplara ait plazma protein C ve protein S düzeylerinin ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, ortanca, p ve t değerleri

Gruplar	n	Protein C (%)				Protein S (%)					
		Ort	ss	min	max	ort	Ort	ss	min	max	ort
İşçi	34	83 ± 21		61	149	79	86 ± 34		46	149	68
Kontrol	32	114 ± 24		85	161	107	124 ± 21		89	154	131
p değeri				0.001					0.001		
t değeri				5.711					5.453		

n: olgu sayısı %: yüzde inhibisyon ort:ortalama ss: standart sapma min: minimum max:maksimum ort: ortanca

Tablo 2. Gruplara ait plazma antitrombin III ve trombin zamanının ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, ortanca, p ve t değerleri

Gruplar	n	Antitrombin III (%)				Trombin zamanı (sn)					
		Ort	ss	min	max	ort	Ort	ss	min	max	ort
İşçi	34	89 ± 17		46	114	87	25 ± 8		11	52	24
Kontrol	32	107 ± 15		82	128	111	15 ± 3		11	21	15
p değeri				0.001					0.001		
t değeri				4.528					-6.858		

n: olgu sayısı %: yüzde inhibisyon ort:ortalama ss:standart sapma min:minimum max:maksimum ort:ortanca

hastalarda protein S düzeylerinde azalmaya ve doku kültürlerinde protein C' nin aktivasyonunda etkili olan endotel hücre yüzeyindeki protein C reseptörleri (EPCR) ve koagülasyon sisteminin düzenlenmesine katkıda bulunan ve trombinin hücre yüzey reseptörü olan trombomodülinin kaybına neden olduğunu rapor etmişlerdir.¹⁷ Ayrıca endotelial hücre kültüründe TNF- α nın, hücre yüzeyinde APC' nin protein S ile kompleks yapmasını önleyerek ve trombin aracılı APC aktivasyonunu azaltarak koagülasyon sistemini aktifleştirdiği gösterilmiştir.¹⁸

IL-6' nın antikoagülan proteinlerle ile etkileşimi TNF- α dan farklılık göstermektedir. Hooper ve arkadaşları hem IL-6 hemde IL-6 + solubl IL-6 reseptör kombinasyonu ile inkübe edilen HUVEC, HMEC-1 ve HepG-2 hepatoma hücre kültüründe protein S üretiminde ve C4b protein salınımlarında artış gözlenirken protein C üretiminin etkilenmediğini göstermişlerdir.^{19,20} Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında ise HepG-2 hepatoma hücre kültürlerinde gözlenen IL-6 nın protein S üretimi

ve C4b protein salınımları üzerine etkilerinin TNF- α tarafından baskılandığını rapor etmişlerdir.^{21,22}

Vila ve arkadaşları²³ IL-6' nın C4b bağlayan protein sentezini artırarak serbest protein S miktarını azalttığını, serbest protein S ve C4b bağlayan protein ile IL-6 arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından IL-6 yüksekliği ile protein C düşüklüğünün beraber olduğu fakat bu düşüklüğün anlamlı olmadığı rapor edilmiştir.

Antikoagülan sistem bileşenleri de TNF- α ve IL-6 üzerine benzer etkiler oluşturmaktadır. İnsan idrarından elde edilen trombomodülinin farelerde intravenöz enjeksiyonunun, endotoksinin neden olduğu TNF- α ve IL-6 miktarındaki artışı önlediği Ohmori ve arkadaşları²⁴ tarafından rapor edilmiştir. Antikoagülan protein APC infüzyonunun mononükleer fagositlerin fagositik ve bakteri öldürme fonksiyonlarını etkilemeden TNF- α gibi bazı sitokinlerin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁵ Ayrıca, APC ile tedavinin koagülasyon ve

inflamasyonun belirteçleri olan D-dimer ve IL-6 düzeylerinde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir.²⁶

Septik şoklu hastalarda AT III ve PAI-1 ile TNF- α ve IL-6 arasında korelasyon olduğu rapor edilmiştir.²⁷ Larsen ve arkadaşları²⁸ inflamatuvar barsak hastalığı olan kişilerde beklenen ölçüde olmasa bile azalmış protein C ve artmış IL-6 seviyeleri arasında korelasyon gözlemişlerdir.

Dolayısı ile işçi grubunda görülen azalmış protein C, protein S ve antitrombin III aktivitesi, kömür tozunun neden olduğu IL-6 ve TNF- α gibi sitokin üretimindeki artışın etkili olduğunu düşündürmektedir.

AT III plazma trombininin ve faktör Xa' nın major inhibitörüdür. Aynı zamanda aktive olmuş Xa' nında önemli bir inhibitörüdür. AT III eksikliği trombin oluşumunda artışa ve hiperkuagulobiteye yol açar. Elque ve ark yaptıkları çalışmada plazma AT III seviyesindeki orta derecede azalmanın fibrin oluşumunu artırdığını ve pıhtılaşma zamanını kısalttığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada işçi grubu plazma TT süresinde artış gözlenmiştir. Bu artış antikoagülan protein düzeylerindeki azalmadan kaynaklanmış olabilir. Nitekim endemik hepatosplenik schistosomiasisli hastalarda görülen TT deki artışın protein C, protein S ve antitrombin III seviyelerindeki azalma ile birlikte olduğu Omran ve arkadaşları²⁹ tarafından rapor edilmiştir. TT yükselmesinde kömür tozunun neden olduğu IL-6 miktarındaki artışta etkili olabilir. Mestries ve arkadaşları³⁰ maymunlarda IL-6 enjeksiyonunun trombin zamanında artışa neden olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca maden işçileri ile ilgili yaptığımız başka bir çalışmada gözlemlediğimiz artmış fibrin yıkım ürünlerinin TT süresinde artışa neden olduğu Mischke ve arkadaşları³¹ tarafından gösterilmiştir.

Kömür tozunun neden olduğu IL-6 artışı ayrıca fibrinojen ve PAI-1' in plazma konsantrasyonunu artırır. Bu da arter duvarındaki çizgili kas hücrelerinin lokal trombotik stimülasyonunda artışa neden olur ve bir sistemik prokoagülan etki oluşturabilir.³² Ayrıca sitokinler, özellikle IL-6, yeni

platelet oluşumunu uyarmakta ve prokoagülan aktivitede artışa neden olmaktadır.¹⁶

Sonuç olarak; çalışmamızda işçi grubunda doğal antikoagülan protein düzeylerinin düşük bulunması kömür tozunun özellikle TNF- α aracılığı ile antikoagülasyon sistemde inhibisyona ve dolayısıyla koagülasyon sistemin aktifleşmesine neden olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca IL-6 nın biyolojik olarak aktif form olan serbest protein S miktarında azalmaya neden olması koagülasyon sisteminin aktivasyonuna katkıda bulunabilir. Faktör IX ve X gibi aktifleşmiş faktörleri inhibe eden antitrombin III miktarındaki azalma da damar içi pıhtılaşmaya yatkınlığı artırabilir. Bu durum kömür ocaklarında yer altında çalışan işçilerin uzun süreli kömür tozuna maruz kalmaları sebebi ile tromboembolik hastalıklar gelişimi yönünden risk altında olduklarını düşündürmektedir. Bu hastalıklara yakalanma riski nedeniyle işçilerin belirli periyotlarla kontrol edilmeleri yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Green FHY, Vallyathan V. Coal workers' pneumoconiosis and pneumoconiosis due to other carbonaceous dusts. In: Churg A, Green FHY, editors. Pathology of Occupational Lung Disease. 2nd ed. Philadelphia: Williams Wilkins; 1998. p. 129-208.
2. Schins RP, Borm PJ. Mechanisms of mediators in coal dust induced toxicity: a review. Ann Occup Hyg 1999; 43(1): 7-33.
3. Zhang Q, Huang X. Induction of interleukin-6 by coal containing bioavailable iron is through both hydroxyl radical and ferryl species. J Biosci 2003; 28(1): 95-100.
4. Zhai R, Liu G, Ge X, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis. Respir Med 2002; 96(10): 829-34.
5. Borm PJ, Palmes N, Engelen JJ, Buurman WA. Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor-alpha (TNF) from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. Am Rev Respir Dis 1988; 138(6):1589-94.
6. Gosset P, Lassalle P, Vanhee D, et al. Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed in vitro to coal mine dust. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 5(5): 431-6.
7. Schins RP, Borm PJ. Plasma levels of soluble tumour necrosis factor receptors are increased in coal miners with pneumoconiosis. Eur Respir J 1995; 8(10): 1658-63.
8. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. Thromb Haemost 1993; 70(1): 29-35.
9. Esmon CT. Coagulation and inflammation. J Endotoxin Res 2003; 9(3): 192-8.

10. Heeb MJ, Espana F, Griffin JH. Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989; 73(2): 446-54.
11. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(7): 2728-32.
12. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268(4): 2872-7.
13. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem* 1994; 269(33): 21051-8.
14. van 't Veer C, Hackeng TM, Delahaye C, Sixma JJ, Bouma BN. Activated factor X and thrombin formation triggered by tissue factor on endothelial cell matrix in a flow model: effect of the tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1994; 84(4): 1132-42.
15. Handin RI, Loscalzo J. Hemostasis, Thrombosis, Fibrinolysis, and Cardiovascular Disease. In: Braunwald E, editor. *Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 1772-3.
16. Hooper WC, Phillips DJ, Evatt BL. TNF-alpha suppresses IL-6 upregulation of protein S in HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Res* 1996; 81(3): 315-26.
17. Esmo CT. Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12(3): 343-59.
18. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163(3): 740-5.
19. Hooper WC, Phillips DJ, Ribeiro M, Benson J, Evatt BL. IL-6 upregulates protein S expression in the HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Haemost* 1995; 73(5): 819-24.
20. Hooper WC, Phillips DJ, Evatt BL. Endothelial cell protein S synthesis is upregulated by the complex of IL-6 and soluble IL-6 receptor. *Thromb Haemost* 1997; 77(5): 1014-9.
21. Hooper WC, Phillips DJ, Evatt BL. TNF-alpha suppresses IL-6 upregulation of protein S in HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Res* 1996; 81(3): 315-26.
22. Phillips DJ, Novinger MS, Evatt BL, Hooper WC. TNF-alpha suppresses IL-1 alpha and IL-6 upregulation of C4b-binding protein in HepG-2 hepatoma cells. *Thromb Res* 1996; 81(3): 307-14.
23. Vila N, Reverter JC, Yague J, Chamorro A. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20(3): 325-9.
24. Ohmori Y, Takahashi Y. Thrombomodulin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2000; 116(5): 283-9.
25. Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol* 1994; 153(8): 3664-72.
26. van Deventer SJ, Pajkrt D. Activated protein C, coagulation, inflammation, and treatment of severe sepsis. *Ned Tijdschr Geneesk* 2001; 145(13): 613-6.
27. Massignon D, Lepape A, Bienvenu J, Barbier Y, Boileau C, Coeur P. Coagulation/fibrinolysis balance in septic shock related to cytokines and clinical state. *Haemostasis* 1994; 24(1): 36-48.
28. Larsen TB, Nielsen JN, Fredholm L, et al. Platelets and anticoagulant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32(2): 92-6.
29. Omeran SA, el-Bassiouni NE, Hussein NA, Akl MM, Hussein AT, Mohamed AA. Disseminated intravascular coagulation in endemic hepatosplenic schistosomiasis. *Haemostasis* 1995; 25(5): 218-28.
30. Mestries JC, Kruithof EK, Gascon MP, Herodin F, Agay D, Ythier A. In vivo modulation of coagulation and fibrinolysis by recombinant glycosylated human interleukin-6 in baboons. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5(3): 275-81.
31. Mischke R, Wolling H. Influence of fibrinogen degradation products on thrombin time, activated partial thromboplastin time and prothrombin time of canine plasma. *Haemostasis* 2000; 30(3): 123-30.
32. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 2001; 103(13): 1718-20.