

1999-00041



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**PROJE NO: SBAG-1821**



Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu  
Health Sciences Research Committee

**17 $\beta$ -ESTRADIOL'UN ENDOTEL HÜCRELERİNİN DOKU  
FAKTÖRÜ YOLU İNHİBİTÖRÜ SALINIMI ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİ**

**PROJE NO: SBAG-1821**

**PROF. DR. KAYA EMERK  
DOÇ. DR. SERPİL BİLSEL  
DR. HADİ MOİNİ  
AR. GÖR. NURPERİ ONARAN**

*Marmara Ün. Tıp F.  
Biyokimya ABD.*

**ARALIK  
İSTANBUL**

*Say. 20*

*Ref. 40*

## İÇİNDEKİLER

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| <b><u>1.</u> Önsöz</b>                   | <b>1</b>  |
| <b><u>2.</u> Abstract</b>                | <b>2</b>  |
| <b><u>3.</u> Özet</b>                    | <b>4</b>  |
| <b><u>4.</u> Giriş ve Genel Bilgiler</b> | <b>6</b>  |
| <b><u>5.</u> Materyal ve Metod</b>       | <b>9</b>  |
| <b><u>6.</u> Bulgular</b>                | <b>11</b> |
| <b><u>7.</u> Tartışma</b>                | <b>14</b> |
| <b><u>8.</u> Kaynaklar</b>               | <b>17</b> |

## **TABLO VE ŞEKİLLER**

Sayfa 12 Şekil 1. 6 saatlik bazal ve trombin ile inkübasyonda farklı E2 konsantrasyonlarının HUVEC'ten TFPI salınması üzerine etkisi.

Şekil 2. 24 saatlik bazal ve trombin ile inkübasyonda farklı E2 konsantrasyonlarının HUVEC'ten TFPI salınması üzerine etkisi.

Sayfa 13 Tablo 1. Heparin ile uyarılmış hücrelerde  $17\beta$ -estradiol'un HUVEC'ten TFPI salınımı üzerine etkisi.

## ÖNSÖZ

Estrojenlerin, kardiovasküler hastalıkların gelişmesini önlediğine dair kanıtların artmasına karşın estrojenin trombozis riskini arttırdığına dair bulgular halen tartışma konusudur. Epidemiyolojik çalışmalar, oral kontraseptif (OK) kullanımı ile trombozis gibi kardiovasküler hastalıkların riskinin artması arasında bir ilişki göstermektedir. Bu risk OK'lerdeki estrojen içeriğinin azaltılması ile paralel olarak azalmıştır. Estrojenin plazma pıhtılaşma faktörlerini değiştirdiği bilinmektedir. Postmenopozal kadınlarda estrojen takviyesinde plazma pıhtılaşma faktörlerinde de aynı etki gözlenmekte ve plazma fibrinojen ve faktör VII düzeyleri artmaktadır. Bu artış hiperkoagübilite yaratmaktadır. Estrojenin arterial ve venöz tromboz riskini artırma mekanizması henüz bilinmemektedir. Ancak trombus oluşmasında endotel tabakasının, kan içeriğinin ve akımının rolü olduğu bilinmektedir. Epidemiyolojik bir çalışmada plazma faktör VIIa'nın koroner kalp hastalıkları için iyi bir gösterge olduğu bildirilmesinden beri çalışmalar doku faktörü yolu üzerinde yoğunlaşmıştır. Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) endotel hücrelerden sentezlenen pıhtılaşmanın doku faktörü yolunu kontrol eden önemli bir antikoagulan proteindir. Klinik çalışmalarda plazma TFPI düzeylerinin cinsiyete bağlı değişmesi ve kadınlarda 50 yaşın üzerinde arttığının gösterilmesi estrojenin endotel hücrelerinden TFPI salınımı üzerindeki etkisini araştırmaya yönlendirmiştir.

Bu proje Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir.

## **ABSTRACT**

### **EFFECT OF 17 $\beta$ -ESTRADIOL ON TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR RELEASE FROM ENDOTHELIAL CELLS**

Since the introduction of oral contraceptives containing estrogen in the early 1960s, several epidemiologic studies have reported an association between their use and increased risk of vascular disease such as thrombosis and thromboembolic strokes. The risk appears to be decreased in parallel with reduction in estrogen content of the pills. Also it is well known that in pregnancy and during estrogen replacement therapy coagulation and fibrinolytic activity are changed. Although many attempts have been made to explain the epidemiologic data on the basis of observed changes within hematologic parameters, the role of estrogen in hemostasis has not been clarified yet. In spite of the increasing evidence that estrogen have protective effects on vascular system, the evidence that estrogen may contribute to the risk of thrombosis is still being debated. Therefore we investigated the effect of 17 $\beta$ -estradiol (E2) on tissue factor pathway inhibitor (TFPI) release of cultured human umbilical vein endothelial cells(HUVEC). In this study HUVEC were harvested by collagenase treatment (Type 1A) according to the method of Jaffe et al. and cultured on multivelled plates with medium 199 supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. The cells stimulated with trombin (4u/ml) were incubated with or without E2 (1 and 100 nM) for 24 hours. Or the cells were stimulated with heparin (0.1u/ml for 15 min) after incubation with or without E2 (1nM) for 24 hours. After the incubations TFPI level of media

were measured by IMUBIND Total Eliza kit (American diagnostica inc.).

Our results demonstrates that  $17\beta$ - estradiol significantly decrease TFPI even in the presence or absence heparin or thrombin. These results show that  $17\beta$ - estradiol shifts the hemostatic balance towards the procoagulant phase through lowering the TFPI levels secreted by the endothelium. Adverse effects of estrogens on hemostasis may find some answers through this mechanism.

**Key words:** TFPI,  $17\beta$ -Estradiol, HUVEC

## ÖZET

### **17 $\beta$ -ESTRADIOL'ÜN ENDOTEL HÜCRELERİNDEN DOKU FAKTÖRÜ YOLU İNHİBİTÖRÜ SALINIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

1960'lı yılların başlarında estrojen içeren doğum kontrol haplarının kullanılmaya başlamasından itibaren yapılan birçok epidemiyolojik çalışmalar bu ilaçların kullanımı ile trombozis ve tromboembolik strokes gibi damar hastalıklarının riskinin arttığını gösterilmiştir. Bu risk doğum kontrol haplarındaki estrojen içeriğinin azaltılmasına paralel olarak düşmüştür. Hamilelik ve hormon replasman tedavisi sırasında pıhtılaşma ve fibrinolitik aktivitenin değiştiği bilinmektedir. Epidemiyolojik verileri hematolojik parametreler ile açıklamak üzere birçok çalışma yapılmasına rağmen hemostasta estrojenin rolü henüz bir açıklık kazanmamıştır. Estrojenin vaskular sistemde koruyucu etkisine dair kanıtlar artmasına rağmen, estrojen'in thrombus riskini arttırması halen tartışma konusudur. Bu nedenle biz 17 $\beta$ -estradiolun endotel hücre kültüründen doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) salınması üzerindeki etkisini inceledik. Bu çalışmada insan göbek kordonu veni endotel hücreleri (HUVEC) Jaffe ve arkadaşlarının metoduna uygun olarak kollogenaz ile muamele edilerek söküldü ve çok kuyulu kültür kaplarına ekildi. %10 FCS ve antibiyotik ile desteklenmiş Medium-199 ile büyütüldü. Subkonfluent hücreler estrojensiz(-E2) veya estrojen içeren (+E2) fenol kırmızısı içermeyen medyum-199 M3769 ile 48 saat inkübe edildi. Her iki grup hücreler %0.1 BSA içeren stok M-199 M3769 +Trombin (4u/ml) ile veya trombinsiz olarak 24 saat

inkübasyona konuldu. Bir kısım hücreler ise +E2 veya -E2'siz medyumda 48 saat inkübe edildikten sonra %0.1 BSA içeren M3769 da 24 saat bekletildi. Her iki grup heparin (0.1u/ml).ile veya heparinsiz ortamda 15 dakika uyarıldı. İnkübasyondan sonra ortamdaki TFPI düzeyleri IMUBIND Total Eliza kit (American diagnostica inc.) ile ölçüldü. Sonuçlarımız heparin ve trombin ile uyarılmış veya uyarılmamış hücrelerde 17 $\beta$ - estradiolun TFPI düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğünü gösterdi. 17 $\beta$ -Estradiol'un TFPI düzeylerini düşürerek hemostatik dengeyi prokoagulan yönde etkilemesi, hemostasda estrogenin zıt etkilerini açıklıyor olabilir.

**Anahtar kelime:** TFPI, 17 $\beta$ -Estradiol, HUVEC

## **GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER**

Bilindiği gibi menopoza öncesi kadınlarda ateroskleroz riski ve miyokard infarktüsü sıklığı, aynı yaş grubundaki erkeklere oranla çok daha azdır. Menopozdan sonra ise bu sıklık birden artmaktadır. Bilateral oofektomi yapılması nedeniyle erken menopoza giren kadınlarda vasküler hastalığa ilişkin semptom ve bulgular daha sık olarak ve erken yaşlarda gelişmektedir. Bütün bunlar kadınların ateroskleroza karşı estrojen tarafından korunduğu görüşünü doğurmuştur(14,23). Buna karşılık yapılan epidemiyolojik çalışmalar estrojen ve progesteron içeren oral kontraseptif (OK) kullanan kadınlarda tromboembolik hastalıkların arttığını göstermiştir(3,4). “Committee On Safety of Drugs” ve “Royal College of General Practitioner” çalışma grupları yayınladıkları makalelerde venöz tromboembolizm, serebral ve kronik tromboz riski ile kullanılan oral kontraseptiflerin estrojen dozu arasında önemli bir paralellik olduğunu bildirmişlerdir(6,13,34). Buna bağlı olarak son 20 yılda OK’lerde bulunan estrojen progesteron miktarlarında ayarlamalar yapılmış ve hormon miktarları azaltılmıştır(4).

Ayrıca estrojenlerle tedavi edilen prostat kanserli olgularda, kardiovasküler hastalıklardan ölümlerin yüksek olduğu bildirilmiştir(7,8). Miyokard infarktüsü geçirdikten sonraki dönemde estrojen uygulanan kadınlarda yeni bir infarktüs oluşma sıklığı, aynı yaş grubundaki estrojen almayan kadınlara kıyasla çok yüksektir ve uygulanan estrojen dozu ile doğrudan ilişkilidir(32). 1966 yılından beri estrojen içeren oral kontraseptiflerin plazma pıhtılaşma faktör düzeylerini etkilediği

bilinmektedir(33). Postmenopozal kadınlarda da estrogen ile yapılan takviyelerde plasma pıhtılaşma faktörlerinde aynı etki gözlenmekte ve plasma fibrinojen ve faktör VII düzeyleri artmaktadır(1,5,6). Bu artış hiperkoagübilite yaratmaktadır. Oral kontraseptif alan kadınlarda artan trombin-antitrombin III kompleks miktarı, trombin oluşumunun göstergesi olarak bunu doğrulamaktadır(22,35). Ayrıca fibrin parçalanma ürünlerinin artmış olmasıda koagülasyon artışını göstermektedir. Artan pıhtılaşmanın nedeninin azalan koagülasyon inhibisyonu olmadığı, koagülasyon inhibitörleri olan antitrombin III, protein S ve C düzeylerinin OK kullanımı ile fazla değişikliğe uğramadığının anlaşılması ile ortaya çıkmıştır (17,18,19). Fakat bu konuda çelişkili raporlar vardır(27). Seks hormonlarının neden olduğu trombozis riski pıhtı oluşumunun kolaylaşması kadar pıhtının yıkılmasındaki yavaşlamaya bağlı olabilir. Hemostatik bozukluklar ile fibrinolitik sistem arasındaki kuvvetli paralellik çeşitli araştırmacıları oral kontraseptif kullanmanın fibrinolitik sistem üzerinde etkilerini araştırmaya yönlendirmiş ve yapılan çalışmalar fibrinolitik sistemde rol alan çeşitli proteinlerin plasma düzeylerinin OK kullanımı ile değiştiğini göstermiştir. OK kullanan kadınlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda plasma tPA aktivitesinde dramatik artış olduğu, PAI'da ise azalma olduğu gösterilmiştir(16,19).

Estrogen ve progesteronların doza bağlı olarak arterial ve venöz trombozis riskini etkilediği bilinmekle beraber mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Bir kısmı endotel kaynaklı olan ve trombus-fibrinoliz sisteminde rol alan faktörlerin çokluğu bu karmaşık mekanizmanın tümüyle aydınlatılmasını zorlaştırmıştır. Ancak kesin olarak bilinmektedir ki trombus oluşmasında endotel tabakasının, kan içeriğinin ve akımının rolü vardır.

Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) endotel hücrelerinde sentezlenen

ve doku faktörü ile aktive olan, koagulasyon yolunu kontrol eden önemli bir antikoagulan proteindir. Vasküler sistemde mevcut olan TFPI'nün %20'sinin plazma lipoproteinlerine bağlı olduğu, %2.5'nin trombositler içinde, %75'nin ise endotel hücrelerinde heparin ile serbestleşebilir şekilde bulunduğunu gösterilmiştir. Serbest TFPI ise antikoagulan etkisini faktör Xa ve VIIa/TF kompleksini inhibe ederek gerçekleştirmekte ve doku faktörü pıhtılaşma yolunu kontrol etmektedir(39). Northwick Park Heart çalışmasında plazma faktör VIIa'nın artmasının koroner kalp hastalıkları için iyi bir gösterge olduğu rapor edilmesinden beri çalışmalar doku faktörü koagulasyon yolağı üzerinde yoğunlaşmıştır(28). Mutant doku faktörünün kullanıldığı yeni bir çalışmada, faktör VIIa'nın kalp damar hastalıklarında arttığı gösterilmiştir(25). Aynı şekilde plazma TFPI düzeylerinin kalp-damar hastalığı olan kişilerde arttığı rapor edilmiştir(29,38). Yapılan klinik çalışmalar plazma TFPI düzeylerinin cinsiyete bağlı olarak farklılık gösterdiğini, 50 yaşın altındaki kadınlarda erkeklerden daha düşük olduğunu ve 50 yaşın üzerinde arttığını göstermektedir(1). Ancak bu değişmelerde estrogenlerin direk rolü olup olmadığı araştırılmamıştır. Bu çalışmada kontrol ve heparin veya trombin ile uyarılmış hücrelerde 17 $\beta$ -estradiol'un belli zaman aralığında TFPI salınımı üzerine etkisi incelenmiştir.

## **MATERYAL VE METOD**

### **Endotel Hücre kültürü**

Endotel hücreleri insan göbek kordonu veninden kollagenaz yardımı ile Jaffe ve ark.'nın metoduna uygun olarak izole edildi(15). Hücreler 24 kuyulu plastik steril kültür kaplarına ekilerek %20 fetal sığır serumu (FCS)(Sigma), antibiyotikler; penicillin (80 unit/ml), streptomycin (80ug/ml) ve amphotericin B (2ug/ml) içeren medium-199 (1ml/kuyu) ile 37<sup>0</sup>C'de CO<sub>2</sub> etüvünde büyütüldü. Hücreler subkonfluent olana kadar medyum her 48 saatte bir değiştirildi. Her bir kuyuda ~150.000 hücre olduğu saptandı. Subkonfluent hücrelerin medyumları atıldı. Ve onun yerine estrojensiz (-E2) veya estrogen içeren (+E2) (1nM, 100 nM) medyum 199 M3769 konuldu ve 48 saat inkübe edildi. Hormon içermeyen medyum, FCS'nin aktif kömür ile inkübe edildikten sonra fenol kırmızısı içermeyen medyum 199 M3769'a ilave edilmesi ile hazırlandı. Estrogen içeren medyum, aktif kömür ile muamele edilmiş FCS konmuş medyuma E2 ilave edilmesi ile hazırlandı. -E2 ve +E2 medyumda 48 saat inkübe edilen hücreler %0.1 BSA içeren stok medyum 199 M3769 + trombinli (4u/ml) veya trombin içermeyen olarak 24 saat inkübe edildi. Bir kısım hücreler ise -E2 ve +E2 medyumda 48 saat inkübe edildikten sonra %0.1 BSA içeren stok medyum 199 M 3769'da 24 saat inkübe edildi daha sonra heparin (0.1u/ml) ve heparinsiz ortamda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

### TFPI düzeyleri

TFPI düzeyleri, estrojensiz(-E2) ve estrogen içeren (+E2) medyumda bazal şartlarda ve trombin veya heparin ile uyarıldıktan sonra alınan medyum örneklerinde American Diagnostica Firmasının IMUBIND Total Eliza Kiti kullanılarak tespit edildi.

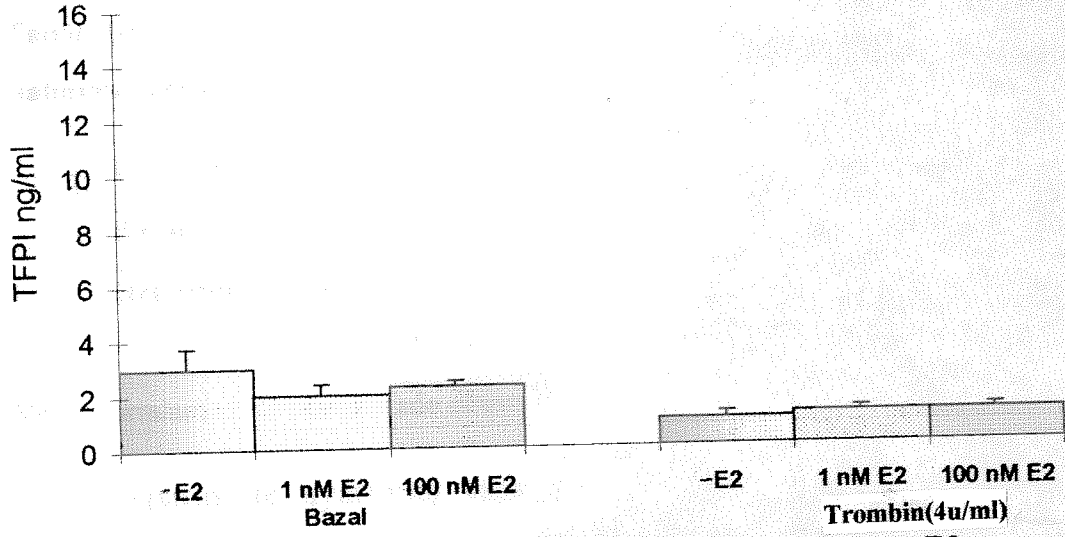
### İstatistikler

İstatistiksel analiz, eşleşmemiş Mann-Whitney-U testi kullanılarak yapıldı. Veriler mean+SEM olarak verildi.

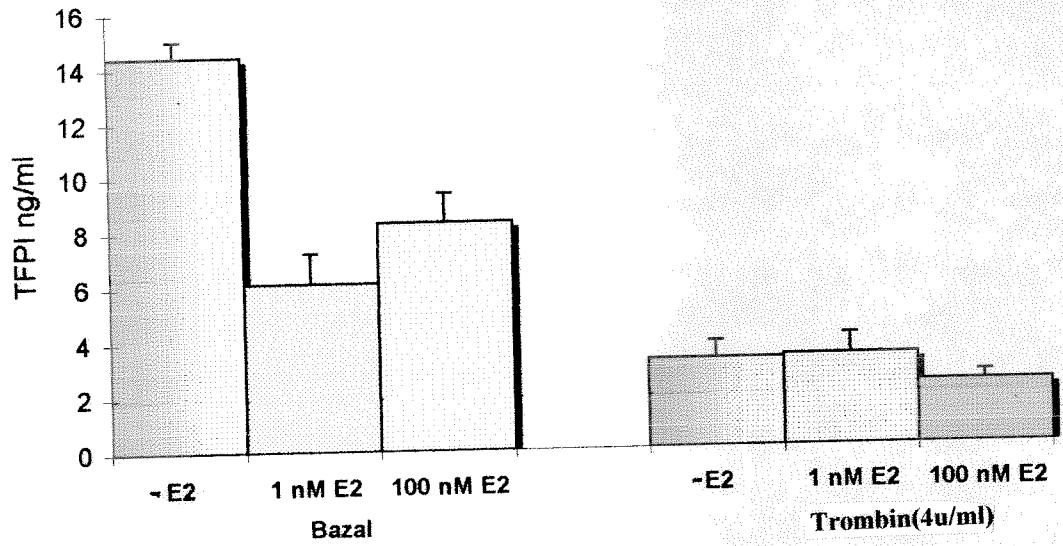
## **BULGULAR**

İnsan göbek kordonu endotel hücre kültürü 24 kuyulu kültür kaplarında subkonfluent (~150000 hücre/kuyu) olduktan sonra  $17\beta$ -estradiol içermeyen ve içeren (1nM, 100nM) fenol kırmısız M-199 (M-3769) ile 48 saat ön inkübasyona bırakıldı. Her iki hücre grubu trombinli (4u/ml) veya trombinsiz 6 ve 24 saat uyarıldı. İnkübasyon sonunda alınan örneklerde TFPI düzeyleri ölçüldü. Herbir gruptan 7 örnekten elde edilen veriler ortalama+SEM olarak ifade edildi (Şekil 1-2).

Bulgularımız,  $17\beta$ -estradiol ile 6 saatlik inkübasyonun endotel hücrelerinden salgılanan ve medyumda ölçülen TFPI miktarını anlamlı olarak etkilemediğini göstermektedir. Buna karşılık E2 inkübasyonu TFPI düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olmuştur. Estrojensiz ortamda 24 saatlik trombin inkübasyonu TFPI düzeylerinde anlamlı azalmaya ve ortamda trombin ile beraber E2 bulunması daha fazla bir azalma yaratamamıştır.



**Şekil 1- 6 saatlik bazal ve trombin ile inkübasyonda E2 konsantrasyonlarının TFPI salınması üzerine etkisi**



**Şekil 2- 24 saatlik bazal ve trombin ile inkübasyonda E2 konsantrasyonlarının HUVEC'ten TFPI salınması üzerine etkisi**

**Tablo: Heparin ile 15 dakika uyarılmış hücrelerde 17 $\beta$ -estradiol'un HUVEC'ten TFPI salınımı üzerine etkisi**

| 17- $\beta$ Estradiol | 0             | 1nm           |         |
|-----------------------|---------------|---------------|---------|
| Bazal                 | 8.6 $\pm$ 3.8 | 5.8 $\pm$ 2.4 | P< 0.05 |
| Heparin(0.1u/ml)      | 5.3 $\pm$ 1.6 | 3.8 $\pm$ 1.3 | P< 0.05 |
|                       | P< 0.05       | P< 0.05       |         |

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir.

Heparin ile uyarılmış veya uyarılmamış endotel hücre kültüründe 17 $\beta$ -estradiol'un TFPI düzeylerini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Buna karşın 17 $\beta$ -estradiol ile inkübe edilmiş veya inkübe edilmemiş hücrelerde heparinin TFPI düzeylerini bazala göre anlamlı olarak azalttığı görülmüştür.

## TARTIŞMA

Estrojenlerin kalp damar sistemi üzerine ve ateroskleroza karşı koruyucu etkileri olduğunun birçok deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar ile kanıtlanmasına karşın estrojenlerin tromboz riskini artırması halen tartışma konusudur. Epidemiyolojik çalışmalar estrojen ve progesteron içeren oral kontraseptif kullanan kadınlarda kalp ve damar hastalıkları riskinin arttığını göstermiştir (3,4,13). Oral kontraseptiflerin hemostatik sistem üzerine etkilerini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır(1,5,6,33). Tromboz riskinin artması, pıhtılaşma faktörlerinin aktive edilmesi yanısıra fibrinolitik aktivitede azalmaya bağlı olabilir. Zira normal şartlarda bu iki sistem dengede bulunmaktadır. TFPI, kan pıhtılaşmasının doku faktörü-F VIIa kompleksi ile başlayan yolağını kontrol eden önemli bir doğal antikoagulandır. TFPI'nin immunolojik olarak baskılanması, tavşanlarda doku faktörü veya endotoksinlerle tetiklenen yaygın damar içi pıhtılaşma eşiğinin düşmesine neden olduğu gösterilmiştir(37). Fizyolojik şartlarda, TFPI'nin önemli miktarı endotelden salgılanmaktadır. Plazmada bulunan TFPI'nin %50-80'nin endotel yüzeyine (muhtemelen glukozaminglikanlara) bağlı bulunduğu ve heparin ilavesi ile salındığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.(36,39)

Bizim çalışmamız  $17\beta$ -estradiol ile uzun süreli 24 saatlik inkübasyonun, endotel hücrelerinden TFPI salgılanmasını anlamlı olarak azaldığını göstermektedir. 6 saatlik inkübasyonda ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. Uzun süreli inkübasyonda bu etkinin görülmesi  $17\beta$ -estradiol'un endotel hücrelerin genomik etki ile TFPI sentezini baskıladığını işaret edebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda erken menapoza giren ve hormon replasman tedavisi gören kadınlarda

TFPI düzeylerinin bazala göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (.12,40).

Estrojenin, önemli bir fizyolojik antikoagulant olan TFPI salınmasını baskılaması estrojen replasman tedavisi, hamilelik, ve OK kullanımı sırasında görülen tromboembolik hastalıkların riskinin artmasından sorumlu olduğu fikrini doğrulamaktadır.

Çalışmada ayrıca E2 ile inkübe edilmiş hücrelerde trombin ve heparin ile uyarmanın TFPI salgılanması üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bulgularımız trombin ile uyarılmış endotel hücrelerinde, trombinin TFPI salınmasını daha fazla azalttığını ve trombin varlığında estradiol'un TFPI düzeylerini daha anlamlı olarak azaltmadığını göstermektedir. Lupu ve arkadaşları TFPI'nın endotel hücrelerinde depolandığını ve trombin ile uyarıldığında hücre yüzeyine çıktığını göstermişlerdir(26). Buna karşın Ohkura ve ark. ise doku faktörü ilave edilen plazmada, recombinant TFPI'nın (rTFPI) fibrin pıhtısına bağlanarak trombin tarafından 3 peptid bağının koparıldığını, dolayısı ile rTFPI'nın inhibitör aktivitesini önemli miktarda azalttığını bulmuşlardır (31). Dolayısı ile bizim çalışmamızda trombinin neden olduğu TFPI düzeylerindeki azalmanın mekanizması TFPI'nın trombin tarafından proteolitik yıkılması olabilir.

Heparin ile uyarılmış hücrelerde 17 $\beta$ -estradiol'un TFPI salınması üzerine etkilerini araştırmak amacı ile yaptığımız çalışmada, bulgularımız, heparinin TFPI düzeylerini azalttığını göstermiştir. 17 $\beta$ -estradiol+ heparinin TFPI düzeylerini bazala göre daha fazla azalttığını göstermiştir. Bizim bulgularımız ile çelişkili olarak Sandset ve ark. heparinin intravenöz verilmesinin doza bağlı olarak TFPI'nın aktivitesinde ve miktarında (antijen düzeyinde) artışa neden olduğunu göstermişlerdir(38).

Son zamanlarda hepatoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada düşük dansiteli lipoprotein reseptör ile ilişkili proteinlerin (LRP), TFPI'nin hücredeki yıkımından sorumlu oldukları gösterilmiştir. TFPI'nin önce ilişkisi olmayan bir reseptöre veya glukozaminoglikanlara bağlandığı ve ardından LRP'ye transfer edildikten sonra endositoz ile içeri alındığı ileri sürülmektedir(30). Damar endotelinin endositoz olaylarda aktif olması aynı zamanda LDL reseptörlerini yüzeyinde ekspresse etmesi endotel hücrelerinin damar içi TFPI'nin sentezi, depolanması ve yıkılmasında önemli rol oynadığını göstermektedir(7). Ho ve ark. ise hücre yüzeyindeki glukozaminoglikanların fonksiyonunu araştırmak için yaptıkları bir çalışmada, heparin sülfat proteoglikan'ların (HSPG), TFPI- FXa kompleksine bağlanıp hücre içine alınmasından ve yıkımından sorumlu bir reseptör gibi iş gördüklerini ileri sürmektedirler. Araştırmacılar HSPG'ların sadece TFPI'de bağlayıp daha yavaş olarak hücre içine aldıklarını göstermişlerdir(11). Dolayısı ile heparinin neden olduğu TFPI düzeylerindeki azalma, heparinin TFPI'yi bağlayarak hücre içine alınmasına yol açması olabilir.

Bizim bulgularımız heparin veya trombin ile uyarılmış  $17\beta$ -estradiol ile inkübe edilen veya edilmeyen hücrelerde TFPI düzeylerinin azaldığını göstermektedir. Bu sonuç  $17\beta$ - estradiol'un TFPI antijen düzeylerini azaltarak doku faktör pıhtılaşma yolunun dengesini pıhtılaşmayı aktive edici yönde değiştirdiğini göstermektedir. Bu bulgu estrojenin hemostasta olumsuz etkilerini açıklayabilir.

12-Holmström A, Holmström A, Andersson L (1998) Effects of hormone replacement therapy (HRT) on hemostatic parameters. Abstracts of the International Congress on Thrombosis & Vascular Disease, Copenhagen, 1998. Abstracts 113-115.

## KAYNAKLAR

- 1-Abbate R, Pinto S, Rostagno C, Vincenzina B, Rosati D, Guglielmo M.(1990) Effects of long term gestogene containing oral contraceptive administration on hemostasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163, 424- 429
- 2-Ariens R S A, Coppola R, Potenza I, Mannucci P M (1995) The increase with age of the components of the tissue factor coagulation pathway is gender dependent. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 6,433-437.
- 3-Bonnar J (1987) Coagulation effect of oral contraception. *Am J Obstet Gynecol* 157, 1042-8.
- 4-Böttiger L E, Boman G, Eklund G, Westholm B(1980) Oral contraceptives and thromboembolic disease:Effect of lowering estrogen content. *Lancet* 1,1097-1101.
- 5-Daly E, Vessey M P, Hawkins M M, Carson J L, Gough P, Marsh S (1996). Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet* 348, 977-980.
- 6-David J L, Gaspard U J, Gillian D, Rascinet R, Lepot M R (1990) Hemostasis profile in women taking low-dose oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 163, 420-423.
- 7-Hansen J B, Olsen R, Webster P.(1997) Association of tissue factor pathway inhibitor with human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 90, 3568-3578.
- 8-Herinksson P, Edhag O, (1986) Orchidectomy versus oestrogen for prostatic cancer: cardiovascular effects. *Br. Med. J.*, 2, 413-415.
- 9-Herinksson P, Blomback M, Bratt G, Edhag O, Ericson O. (1986) Activators and inhibitors of coagulation and fibrinolysis in patient with prostatic cancer treated with estrogen on orchidectomy. *Thromb. Res.*, 44, 783-791.
- 10-Ho G, Toomey J R, Broze G J, Schwartz A L.(1996) Receptor-mediated endocytosis of coagulation FXa requires cell surface-bound TFPI. *J. Biol. Chem.* 271, 9497-9502.
- 11-Ho G, Broze G J, Schwartz A L.(1997) Role of heparan sulfate proteoglycans in the uptake and degradation of TFPI-coagulation factor Xa complexes. *J. Biol. Chem.* 272, 16838-16844.

12-Hoibraaten E, Hofstad A E, Andersen T O. (1998) Effect of hormon replacement therapy (HRT) on haemostasis in women with CAD. 15<sup>th</sup> International Congress on Thrombosis in Antalya, Turkey, October 16-21 Abstracts Kitabı 325.

13-Inman W H W, Vessey M P, Westerholm B, Englund A. (1970) Thromboembolic disease and the steroidal content of oral contraceptives: a report to the Committee on Safety of Drugs. Br. Med., 2, 203-209.

14-Isles C G, Hole D G, Hawthorne V M, Lever A F. (1992) Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the renfrew and paisley survey: comparison with men. Lancet, 339, 702-706.

15-Jaffe E.A. (1984) Culture and identification of large vessel endothelial cells, In biology of Endothelial Cells. (Ed. E.A.Jaffe), Martinus Nihoff Publisher, Boston 1984. 1-11.

16-Jespersen J, Kluft C. (1958) Increased euglobulin fibrinolytic potential in women on oral contraceptives low in estrogen levels of extrinsic and intrinsic plasminogen activators, prekallekrein, factor XII, and C1 inactivator. Thromb. Haemost., 54, 454-459.

17-Jespersen J, Ingeberg S, Bach E. (1983) Antithrombin III and platelets during the normal menstrual cycle and women receiving oral contraceptives low in oestrogen. Gynecol. Obstet. Invest., 15, 153-162.

18-Jespersen J, (1983) A study of antithrombotic potential in women on oral contraceptives low in estrogen In: Jespersen J, Kluft C, Korsgaard O., Eds. Clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. Esbjerg: South Jutland University Press, 399-419.

19-Jespersen J, Kluft C. (1986) Inhibition of tissue type plasminogen activator in plasma of women using oral contraceptives and in normal women during a menstrual cycle. Thromb. Haemost., 55, 388-389.

20-Jespersen J, Nielsen M T. (1989) Levels of protein S during the normal menstrual cycle and in women on oral contraceptives low in oestrogen. Gynecol. Obstet. Invest., 28, 82-86.

21-Jespersen J, Petersen K R, Skouby S O. (1990) Effect of newer oral contraceptives on the inhibition of coagulation and fibrinolysis in relation to dosage and type of steroid. Am J Obstet Gynecol 163, 396-403

22-Kelleher C C (1990) Clinical aspect of the relationship between oral contraceptives and abnormalities of the hemostatic system: Relation to the development of cardiovascular disease. Am J Obstet Gynecol 163, 392-395.

23-Knopp R H. (1988) The effect of post menopausal estrogen therapy on the incidence of atherosclerotic vascular disease. *Obstet. Gynecol.*, 72, 23S-30S.

24-Kooistra T, Bosme P J, Jespersen J and Klupt C (1990) Studies on the mechanism of action of oral contraceptives with regard to fibrinolytic variables. *Am J Obstet Gynecol* 163, 404-412.

25-Korio K, Miyata T, Sakata T, Matsu T, Kato H. (1994) Fluorogenic assay of activated factor VII: plasma factor VIIa levels in relation to arterial cardiovascular disease in Japanese. *Arterioscler. Thromb.*, 14, 265-274.

26-Lupu C, Lupu F, Dennehy U, Kakkar V V, Scully M F (1996) Thrombin induces the redistribution and acute release of TFPI from specific granules within human endothelial cells in culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 15, 2055-2062.

27-Malm J, Alurell M, Dahlback B. (1988) Change in plasma levels of vitamin K-dependent protein C and S and of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br. J. Haematol.*, 68, 437-443.

28-Meade T W, Mellows S, Brozowic M. (1986) Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Nortwick Park Heart Study. *Lancet*, 2, 533-537.

29-Moor E, Hamsten A, Silveira A. (1994) Relationship of tissue factor pathway inhibitor activity to plasma lipoproteins and myocardial infarction at a young age: *Thromb. Haemost.*, 71, 707-712.

30-Narita M, Bu G, Gillian M O, Higuchi D A, Herz J, Broze G, Schwartz A L. (1995) Two receptor systems are involved in the plasma clearance of TFPI in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 24800-24804.

31-Ohkura N, Enjyoji K, Kamikubo Y, Kato H. (1997) A novel degradation pathway of TFPI: Incorporation into fibrin clot and degradation by thrombin. *Blood* 90, 1883-1892.

32-Philips G B, Castelli, W P, Abott R D, Mcnamara P M. (1983) Association of hyperoestrogenemia and coronary heart disease in men in the Framingham cohort. *Am. J. Med.*, 74, 863-869.

33-Poller L, Thompson J M. (1966) Clotting factors during oral contraception: further report. *Br. Med. J.*, 2, 23-25.

34-Royal College of General Practitioners. Oral contraceptives and health. London: Pitman, 1974.

35-Quenherberger P, Loner U, Kapiotis S, Handler S, Schneider B, Huber J and Speiser W (1996) Increased levels of activated factor VII and decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thrombosis and Haemostasis* 76 (5), 729-734.

36-Sandset P M, Abildgaard U, Larsen M L.(1988) Heparin induces extrinsic coagulation pathway(EPI). *Tromb Res*, 50, 803-813.

37-Sandset P M, Warn-Cramer B J, Maki S L, Rapaport S I. Immunodepletion of extrinsic pathway inhibitor sensitizes rabbits to disseminated intravascular coagulation induced with tissue factor. (1991) *Proc Natl Acad Sci*. 88, 708-712.

38-Sandset P M, Sirnes P A, Abilgaard U. (1989) F VII and extrinsic pathway inhibitor in acute coronary disease. *Br. J. Haematol.*, 72, 391-396.

39-Sandset P M. (1996) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI). An update. *Haemostasis* 26 (suppl 4) 154-165.

40-Tsoukala C, Gialeaki A, Anastasopoulou J. (1998) Hormon replacement therapy on thrombomodulin and tissue factor pathway inhibitor in women with early menopause. 15<sup>th</sup> International Congress on Thrombosis in Antalya, Turkey, October 16-21 Abstracts Kitabı, 389.

## BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: SBAG-1821

2- Rapor Tarihi: 01.03.1998

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 11.1997

12.1998

4- Projenin Adı: 17β-Estradiol'un Endotel Hücrelerinin Doku Faktörü Yolu İnhibitörü Salınımı Üzerindeki Etkisi.

5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:  
Prof.Dr.Kaya Emerk, Doç.Dr.Serpil Bilisel, Dr.Madi Moini,  
Arş.Grv.Nurperi Onaran6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı  
Haydarpasa 81320 İstanbul7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:  
Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Sağlık Bilimleri Araştır-  
ma Grubu Atatürk Bulvarı No.211 Kavaklıdere 06100 Ankara

8- Öz (Abstract): 1960'lı yılların başlarında estrojen içeren doğum kontrol haplarının kullanılmaya başlamasından itibaren yapılan birçok epidemiyolojik çalışmalar bu ilaçların kullanımı ile trombozis ve tromboembolik strokes gibi damar hastalıklarının riskinin arttığını gösterilmiştir. Bu risk doğum kontrol haplarındaki estrojen içeriğinin azaltılmasına paralel olarak düşmüştür. Hamilelik ve hormon replasman tedavisi sırasında pıhtılaşma ve fibrinolitik aktivitenin değiştiği bilinmektedir. Epidemiyolojik verileri hematolojik parametreler ile açıklamak üzere birçok çalışma yapılmasına rağmen hemostasta estrojenin rolü henüz bir açıklık kazanmamıştır. Estrojenin vasküler sistemde koruyucu etkisine dair kanıtlar artmasına rağmen, estrojen'in thrombus riskini artırması halen tartışma konusudur. Bu nedenle biz 17β-estradiolun endotel hücre kültüründen doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) salınımı üzerindeki etkisini inceledik. Bu çalışmada insan göbek kordonu veni endotel hücreleri (HUVEC) Jaffe ve arkadaşlarının metoduna uygun olarak kollogenaz ile muamele edilerek söküldü ve çok kuyulu kültür kaplarına ekildi. %10 FCS ve antibiyotik ile desteklenmiş Medium-199 ile büyütüldü. Subkonfluent hücreler estrojensiz(-E2) veya estrojen içeren (+E2) fenol kırmızısı içermeyen medyum-199 M3769 ile 48 saat inkübe edildi. Her iki grup hücreler %0.1 BSA içeren stok M-199 M3769 +Trombin (4u/ml) ile veya trombinsiz olarak 24 saat inkübasyona konuldu. Bir kısım hücreler ise +E2 veya -E2'siz medyumda 48 saat inkübe edildikten sonra %0.1 BSA içeren M3769 da 24 saat bekletildi. Her iki grup heparin (0.1u/ml) ile veya heparinsiz ortamda 15 dakika uyarıldı. İnkübasyondan sonra ortamdaki TFPI düzeyleri IMUBIND Total Eliza kit (American diagnostica inc.) ile ölçüldü. Sonuçlarımız heparin ve trombin ile uyarılmış veya uyarılmamış hücrelerde 17β- estradiolun TFPI düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğünü gösterdi. 17β-Estradiol'un TFPI düzeylerini düşürerek hemostatik dengeyi prokoagulan yönde etkilemesi, hemostasta estrojenin etkilerini açıklıyor olabilir. Anahtar Kelimeler: TFPI, 17β-Estradiol, HUVEC

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler  
15th International Congress on Thrombosis'de poster olarak yayın-  
landı. Antalya October 16-21 1998.

10- Bilim Dalı: Biyokimya

Doçentlik B. Dalı Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

ISIC Kodu:

11- Dağıtım (\*): ☐ Sınırlı☒ Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu :

☐ Gizli☒ Gizli Değil

(\*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz.