

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

TERHALLE HM, HABERBOSCH W, HÖLSCHERMANN H, MAUS U, PARVIZ B
TILLMANN H, ZAKEL U

*Der Einfluß von Pille und Rauchen auf die prokoagulatorische
Aktivität von Blutmonozyten gesunder junger Frauen*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2000; 10 (5) (Ausgabe
für Österreich), 18-28*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



DER EINFLUSS VON PILLE UND RAUCHEN AUF DIE PROKOAGULATORISCHE AKTIVITÄT VON BLUTMONOZYTEN GESUNDER JUNGER FRAUEN

Summary

Background: Epidemiological studies have shown that the use of oral contraceptives (OCs) is associated with an increased risk of thromboembolic complications. The risk is enhanced in smoking women taking oral contraceptives. The pathogenetic mechanism leading to intravascular coagulation is not known. Circulating monocytes are potent activators of the coagulation cascade through their ability to synthesize procoagulant tissue factor (TF). In the present study we investigated in 64 young and healthy women whether the use of oral contraceptives and / or smoking affects the procoagulant activity (PCA = tissue factor activity, TF) in circulating monocytes.

Methods: Blood monocytes were isolated from women (I) non-smoking and not taking OCs (n = 18), (II) non-smoking, but currently

taking OCs (n = 16), (III) smoking, but not taking OCs (n = 15), (IV) smoking and currently taking OCs (n = 15). The non-stimulated and endotoxin-induced procoagulant activity (PCA) was investigated in a one-stage-clotting assay, the monocyte TF-gene transcription was investigated by RT-PCR. The activation of the TF-gene transcription was analysed with the transcription factor NF- κ B (EMSA) and its inhibitor I κ -B α (Western blot). **Results:** Blood monocytes from non-smoking and OCs taking women (II) and smoking women (III) showed an enhanced PCA compared with non-smoking and not OCs using women (I). Strongest PCA was observed in smoking women combined with current use of OCs (IV). The enhanced PCA in smoking and OCs using women was associated with an increased expression of TFmRNA in monocytes, because of an increased

activity of the transcription factor NF- κ B. Experiments on cultured blood monocytes demonstrated enhanced I κ -B α -degradation in presence of estradiol, suggesting that a direct hormone effect is responsible for the observed increase in monocyte TF expression. **Conclusion:** The procoagulant activity (PCA, tissue factor, TF) of blood monocytes is increased in pre-menopausal women with current use of OCs and smoking. Aberrant TF expression by blood monocytes may contribute to intravascular clotting activation and subsequent thrombotic complications under contraceptive therapy. The further enhancement of tissue factor expression in women who smoke and use OCs may explain the synergistic effect of smoking on the risk of thromboembolic events associated with contraceptive use.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß die Einnahme oraler Kontrazeptiva mit einem gesteigerten thromboembolischen Risiko assoziiert ist. Dieses Risiko wird potenziert, wenn starke Raucherinnen die Pille einnehmen. Unklar ist, welche pathogenetischen Mechanismen für die Thromboseneigung unter oraler Kontrazeption verantwortlich sind. Zirkulierende Blutmonozyten stellen durch ihre Fähigkeit, Tissue Factor zu synthetisieren, potente Aktivatoren der Gerinnungskaskade dar. In der vorliegenden Studie wurde bei 64

gesunden jungen Frauen untersucht, ob die Einnahme oraler Kontrazeptiva und / oder Nikotinabusus Einfluß auf die prokoagulatorische Aktivität (PKA = Tissue Factor-Aktivität, TF) zirkulierender Monozyten hat.

Methoden: Blutmonozyten wurden von (I) Nichtraucherinnen ohne orale Kontrazeption (n = 18), (II) Nichtraucherinnen unter aktueller oraler Kontrazeption (n = 16), (III) Raucherinnen ohne aktuelle Kontrazeption (n = 15), und (IV) Raucherinnen unter aktueller oraler Kontrazeption (n = 15) isoliert. Untersucht wurde in einem one-stage-clotting assay die basale und Endotoxin-induzierbare prokoagulatorische Aktivität (TF-Aktivität),

sowie mittels RT-PCR die TF-Genexpression der Monozyten. Die Aktivierung der TF-Genexpression wurde anhand des Transkriptionsfaktors NF- κ B (EMSA) und seines Inhibitormoleküls I κ -B α (Western blot) analysiert.

Ergebnisse: Blutmonozyten von Nichtraucherinnen unter oraler Kontrazeption (II) und Raucherinnen (III) zeigten im Vergleich zu Nichtraucherinnen ohne Pille (I) eine erhöhte TF-Expression. Höchste PKA-Werte wurden bei Raucherinnen unter aktueller oraler Kontrazeption (IV) gemessen. Die gesteigerte PKA bei Nikotinabusus und oraler Kontrazeption ging, aufgrund einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors

NF- κ B, mit einer gesteigerten Expression von TF-mRNA in den Monozyten einher. Experimente mit kultivierten Blutmonozyten zeigten in Anwesenheit von Estradiol eine gesteigerte I κ -B α -Abnahme, so daß möglicherweise ein direkter Hormoneffekt für den Anstieg der monozytären TF-Expression verantwortlich ist.

Schlußfolgerung: Bei prämenopausalen Frauen ist die PKA von Blutmonozyten unter oraler Kontrazeption und bei Nikotinabusus erhöht. Eine verstärkte monozytäre Tissue Factor-Expression könnte möglicherweise zur intravaskulären Gerinnungsaktivierung und demzufolge zu thromboembolischen Komplikationen unter oraler Kontrazeption beitragen. Die erheblich gesteigerte TF-Expression bei Raucherinnen unter oraler Kontrazeption erklärt möglicherweise den synergistischen Effekt des Rauchens für das Risiko thromboembolischer Ereignisse unter der Einnahme oraler Kontrazeptiva.

EINLEITUNG

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß die Einnahme oraler Kontrazeptiva (OC) mit einem gesteigerten venösen und arteriellen thromboembolischen Risiko einhergehen [1–5]. Vor allem bei Raucherinnen über 35 Jahre konnte eine erhöhte Inzidenz thromboembolischer Ereignisse unter oraler Kontrazeption festgestellt werden [6]. Östrogenabhängige Gerinnungsveränderungen scheinen in der Pathophysiologie der Thromboseentstehung eine wesentliche Rolle zu spielen. Dennoch ließen sich bis

heute die genauen pathogenetischen Effektormechanismen, die für die Thromboseneigung unter oraler Kontrazeption verantwortlich sind, nicht eindeutig klären.

Blutmonozyten sind durch ihre Fähigkeit, prokoagulatorischen Tissue Factor (TF) zu exprimieren, in der Lage, eine Aktivierung intravaskulärer Gerinnungsvorgänge zu initiieren [7, 8]. Tissue Factor, ein Zellmembran-gebundenes Glykoprotein, ist der wichtigste zelluläre Initiator der Gerinnungskaskade durch Aktivierung von Faktor IX und X [9]. Da der Kontakt von Blut mit Tissue Factor zur unmittelbaren Gerinnungsaktivierung führt, unterliegt die Expression dieses Rezeptorproteins einem regulierten Kontrollmechanismus. Daher wird Tissue Factor nur von perivaskulären, nicht jedoch von intravaskulären Zellen exprimiert [10, 11]. Monozyten sind die einzigen zirkulierenden Zellen, die Tissue Factor innerhalb des Gefäßbettes exprimieren können [12, 13]. Eine erhöhte Tissue Factor-Expression wurde für die prothrombotische Situation verschiedener Krankheitsbilder, wie Sepsis [8], Tumorleiden [12], Atherosklerose [13, 14] u. a., verantwortlich gemacht und spielt möglicherweise auch bei den thromboembolischen Komplikationen junger Frauen unter oraler Kontrazeption eine entscheidende Rolle.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, zu untersuchen, ob die monozytäre Tissue Factor-Expression in gesunden prämenopausalen Frauen unter oraler Kontrazeption und / oder Nikotinabusus verändert wird.

METHODEN

Probanden

64 gesunde prämenopausale Frauen, mit einem Durchschnittsalter von 26 Jahren (19–45 Jahre), waren in die Studie involviert. Die täglich für einen Einnahmezyklus von 21 Tagen verwendeten Antikonzeptiva waren Präparate der zweiten (Levonorgestrel; n = 12) und dritten Generation (Desogestrel, Gestoden; n = 19) mit einem Ethinylestradiolanteil von 30 μ g. Die Gruppe der Raucherinnen wurde definiert als Frauen, die mindestens 10 oder mehr Zigaretten pro Tag rauchten. Alle Frauen wiesen zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen regulären Menstruationszyklus auf. Ferner lagen kein erhöhter Blutdruck, keine Stoffwechselerkrankungen, keine aktuelle Infektion oder Medikamenteneinnahme vor. Die Blutentnahme erfolgte morgens im nüchternen Zustand.

Die Frauen wurden nach folgenden Kriterien 4 Gruppen zugeordnet:

- I. Keine orale Kontrazeption, kein Nikotinabusus (n = 18)
- II. Orale Kontrazeption, kein Nikotinabusus (n = 16)
- III. Nikotinabusus, keine orale Kontrazeption (n = 15)
- IV. Nikotinabusus und orale Kontrazeption (n = 15)

Monozytenisolation

Die peripheren Blutmonozyten wurden mittels Dichtezentrifugation über einen Ficollgradienten [15] mit nachfolgender Adhärenz-

aufreinigung an fibronectinbeschichteten, gelatinierten Oberflächen isoliert [16]. Um die Kontamination durch Thrombozyten zu minimieren, wurde die Interphase nach dem Verfahren von Altieri [17] gewaschen. Nach Inkubation der Zellen für eine Stunde bei 37°C in einer feuchtigkeitsgesättigten 5% CO₂-haltigen Atmosphäre wurden die nichtadhärenten Zellen (Lymphozyten) durch einen dreimaligen Waschvorgang gereinigt. Die adhärenen Zellen (Monozyten) wurden in Monozyten-Serumfreien-Medium (MSFM, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) resuspendiert und für die Zellkultur mit einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/1ml MSFM auf 6-Loch-Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert. Um den direkten Effekt von Estradiol auf kultivierte Blutmonozyten zu untersuchen, wurden humane periphere Blutmonozyten aus Buffy coats gesunder Blutspender isoliert [18]. Für die Zellkultur wurden die Zellen in MSFM auf eine Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml eingestellt und in 30 mm 6-Loch-Zellkulturplatten kultiviert. Durch Pappenheim-Färbung und unspezifische Esterasefärbung sowie durch FACS-Analyse konnte die Reinheit der isolierten Monozyten (ca. 98%) bestimmt werden. Die Viabilität der Zellen betrug nach Ethidiumbromid-Färbung und nachfolgender FACS-Analyse ebenfalls über 95%. Alle benutzten Medien und Puffer wurden auf Kontamination durch Endotoxin mit einem Standard-Limulus-Amoebozyt-Test (COATEST, Chromogenix, Mölnådal, Schweden) untersucht. Alle Proben zeigten einen Endotoxingehalt von weniger als 12,5 pg/ml auf der untersten Nachweisgrenze des Tests.

Messung der Tissue Factor-Aktivität

Zur Messung der prokoagulatorischen Aktivität (PKA) wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen homogenisiert. Die Tissue Factor-Aktivität der lysierten Monozyten wurde in einem standardisierten Gerinnungsassay (one-stage-clotting-assay) gemessen [18]. Mittels einer Standardkurve wurden die Gerinnungszeiten in Milliunits (mU) PKA umgerechnet. Die Standardkurve leitet sich aus einer Verdünnungsreihe eines „rabbit-brain“-Thromboplastinstandards (10 mg/ml; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ab, in der Humanplasma in 20 Sekunden (sec) gerinnt und dem ein Wert von 10.000 mU PKA entspricht. Die Gerinnungszeiten wurden linear in einer doppelt-logarithmischen Darstellung zwischen 1 mU (310 sec) und 10.000 mU (20 sec) aufgetragen. Alle Werte wurden in mU/10⁶ Zellen angegeben. Medien, Puffer und Reagenzien zeigten keine PKA. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die prokoagulatorische Aktivität konnte mittels Faktor VII-defizientem Plasma und mit Hilfe eines monospezifischen Antikörpers gegen humanen Tissue Factor als Tissue Factor-Aktivität charakterisiert werden (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT).

RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Isolation der gesamten zellulären RNA wurde die von Chromczynski und Sacchi beschriebene Guanidin-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode benutzt [19]. Pro Ansatz wurde eine Gesamtmenge von 0,5 µg RNA

für die cDNA-Synthese benutzt. Die RNA wurde in einem speziellen Puffer (100 mM Tris HCl, pH 8,3; 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl) zusammen mit 10 mM Dithiothreitol, 15 nM randomisierte Hexanukleotide (Boehringer, Mannheim, Deutschland) als Primer, 20 U RNAsin (Promega, Madison, USA), 1mM jeder dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Perkin Elmer, Norwalk) und 100 U „Moloney murin leukemia virus reverse transkriptase“ (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) in einem Volumen von 25 µl angesetzt. Die komplementäre DNA wurde in einem GeneAmp PCR-System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk) durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einer mit einem speziellen PCR-Puffer auf 25 µl aufgefüllten Stammlösung durchgeführt, die 1 mM spezifischer 5' und 3' Primer, 0,75 U AmpliTac DNA Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk), 1 mM jedes dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Perkin Elmer, Norwalk) und 2 µl cDNA enthielt. Die Sense-Sequenz der TF-spezifischen Primer ist 5'-GCCGCCAACTGGTAGACATG-3', die Antisense-Sequenz 5'-TAGCCAGG ATGATGACAAGG-3'. Die Sense-Sequenz des Kontrollgens β-Aktin ist 5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3', die Antisense-Sequenz 5'-CGGCCATCA CGCCACAGTTT-3'. Der Ablauf der PCR bestand in einer initialen Denaturierung bei 94°C für 90 sec., gefolgt von 25 Zyklen (β-Aktin), und 35 Zyklen (TF) 50 sec. Denaturierung bei 94°C. Die Anlagerung der Primer (Annealing) fand bei 60°C (β-Aktin) und 63°C (TF) statt. Die Sequenzvermehrung (Extension) wurde bei 72°C für 30 sec. durchgeführt. Die abschließende

Extension fand bei 72°C für 7 Minuten statt. Nach Abschluß der PCR wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Von jeder RT-PCR-Probe wurden 15 µl zur Elektrophorese auf ein 1,8% Nusieve/Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophoresezeit betrug bei 100V 2 Stunden. Abschließend wurden die Platten in einem Ethidiumbromidbad (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Negative Kontrollen wurden routinemäßig durch PCR von Proben ohne cDNA durchgeführt, um falsch positive Amplifikationsprodukte auszuschließen. Die Spezifität der TF-PCR-Produkte wurde durch automatisierte DNA-Sequenzierung (Applied Biosystems, Model 373A) verifiziert, indem die gewonnenen cDNA-Sequenzen mit veröffentlichten humanen TF-cDNA-Sequenzen verglichen wurden [20]. TF-mRNA-Level wurden densitometrisch mit einem Bio-Imaging-Analyser quantifiziert (Bio Doc II / NT, Biometra) und anhand der β-Aktin-mRNA genormt. Die Ergebnisse sind als Ratio der TF-mRNA und β-Aktin-mRNA Level dargestellt.

Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Nukleare Extrakte wurden präpariert wie bereits beschrieben [18]. Oligonukleotide des NF-κB-Konsens (5'-AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC-3') wurden mit einer spezifischen DNA-Aktivität > 5 x 10⁷ cpm/µg gleichgesetzt. NF-κB-Bindungen wurden mit 10 mM HEPES, pH 7,9, 0,5 mM EDTA, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 0,025% NP-40, 4% Ficoll, 10 mM PMSF, 1 mg/ml BSA (keine DNase enthaltend) und 0,5 µg/µl Poly dl/dC in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. 10 µg der nuklearen Extrakte wur-

den in Anwesenheit von 2 µg Oligonukleotiden (ca. 50.000 cpm (Cerenkow)) bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden mittels Elektrophorese von der freien DNA-Probe getrennt und radioaktiv markiert, wie bereits im Detail beschrieben [21]. Die Spezifität der Bindung wurde durch Konkurrenz mit einem 160-fachen molaren Exzess von kalten NF-κB-Konsens-Oligonukleotiden und mittels monospezifischer Antikörper gegen NF-κB-Anteile (Santa Cruz Inc., Santa Cruz, USA: anti-p50 #sc-1191X, anti-p65 #sc-109X) ermittelt. Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Analyse (Bio-Imaging-analyser, BAS 2000, Fujix) und TINA-Software (Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt, Deutschland) quantifiziert.

Western Blot-Analyse

Für die Western Blot-Analyse wurden 10 µg zytoplasmatisches Proteinextrakt auf einer 10% SDS/PAGE herausgelöst, auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran übertragen, mit IκBα-spezifischen Antikörpern vom Kaninchen (Santa Cruz: sc-371, Verdünnung von 1:3000, 1 h Inkubation) und Anti-Kaninchen-Antikörpern (Santa Cruz: sc-2004, Verdünnung 1:5000, 1 h Inkubation) versehen. Immunreaktive Proteine wurden mittels Chemiluminiszenz-Kit für Western Blot (Amersham, Arlington Heights, USA) optisch dargestellt.

Experimente

Die Zellkulturen der Monozyten (10⁶ Zellen/ml) wurden über einen Zeitraum von 18 Stunden bei 37°C in einer feuchtigkeitsgesät-

tigten 5% CO₂-haltigen Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit oder ohne LPS (10 µg/ml; Endotoxin 055:B5, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für weitere 6 Stunden zur Bestimmung der TF-Aktivität und 3 Stunden zur Analyse der TF-mRNA-Expression inkubiert. Die Analyse der NF-κB-Bindungsaktivität wurde mit Monozyten ohne LPS-Stimulation durchgeführt. Die Experimente wurden mit dreimaligem Einfrieren (-80°C) und Auftauen der Ansätze zur späteren Messung beendet.

Um den direkten Effekt von Estradiol auf kultivierte Monozyten/Makrophagen zu untersuchen, wurden weitere in vitro-Experimente vorgenommen. Die in vitro-Stimulation von Monozyten/Makrophagen (10⁶ Zellen/ml) aus Buffy coats von gesunden Blutspendern wurde mit Konzentrationen von 0,1–1000 ng/ml 17β-Estradiol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ohne LPS-Stimulation durchgeführt. Nach einer 24 stündigen Inkubationszeit mit Estradiol wurde die TF-mRNA-Expression und nach 8 Stunden Estradiol-Inkubation wurde die NF-κB-Bindungsaktivität und IκBα-Proteinlevel analysiert.

Statistik

Die statistische Analyse wurde vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen mit SPSS für Windows vorgenommen. Bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse handelte es sich im wesentlichen um vergleichende Untersuchungen. Für die zu untersuchenden Einflüsse oraler Kontrazeptiva und Nikotinabusus auf die Tissue Factor-Expres-

sion von Monozyten wurde eine zweifache Varianzanalyse (ANOVA) mit den Variablen der basalen und Endotoxin-induzierbaren Tissue Factor-Aktivität angewandt. Vergleiche der einzelnen vier Gruppen untereinander wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) durch paarweisen Gegensatz nach Scheffe vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde dabei mit $p < 0,05$ festgesetzt.

ERGEBNISSE

Monozyten TF-Expression

Unter oraler Kontrazeption und Nikotinabusus ist die TF-Expression von Blutmonozyten gesteigert (Abb. 1): Die monozytäre TF-Akti-

vität von Nichtraucherinnen unter oraler Kontrazeption (OC) ist sowohl in unstimulierten ($p < 0,05$) (Abb. 1A) als auch in stimulierten ($p < 0,001$) (Abb. 1B) Zellen, verglichen mit Nichtraucherinnen ohne OC, erhöht. Die TF-Aktivität von Blutmonozyten bei Raucherinnen ist im Vergleich zu Nichtraucherinnen deutlich gesteigert ($p < 0,001$). Dies gilt sowohl für Frauen ohne OC als auch für Frauen mit OC ($p < 0,001$). Die höchste monozytäre TF-Aktivität fand sich bei Raucherinnen unter aktueller OC-Einnahme. Der Effekt von OC auf die monozytäre TF-Aktivität wurde als unabhängig vom Nikotinabusus getestet (kein Signifikanzniveau in der zweifachen Varianzanalyse ANOVA). Dabei zeigten Monozyten von

Raucherinnen unter OC-Einnahme eine signifikant erhöhte TF-Aktivität verglichen mit Nichtraucherinnen unter OC-Einnahme ($p < 0,05$). Keine statistische Signifikanz konnte zwischen Raucherinnen ohne OC und Nichtraucherinnen mit OC gefunden werden. Die erhöhte TF-Aktivität in Monozyten von Frauen unter OC und/oder Nikotinabusus korrelierte nicht mit einer erhöhten Anzahl an Monozyten. Ebenfalls ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl peripherer Blutmonozyten zwischen den einzelnen Gruppen ausmachen. Ferner konnte kein Unterschied in der monozytären TF-Expression unter OC der zweiten und dritten Generation beobachtet werden.

Abbildung 1A: Erhöhte TF-Aktivität in peripheren Blutmonozyten von Frauen unter oraler Kontrazeption und Nikotinabusus. Dargestellt ist die TF-Aktivität unstimulierter Monozyten/Makrophagen. Jeder Punkt repräsentiert die monozytäre TF-Aktivität der einzelnen Probandinnen der entsprechenden Gruppen: I. Keine orale Kontrazeption (OC), kein Nikotinabusus; II. Orale Kontrazeption, kein Nikotinabusus; III. Raucherinnen ohne orale Kontrazeption; IV. Raucherinnen unter oraler Kontrazeption. Die Linien stellen den Mittelwert der einzelnen Gruppen dar. Oben aufgeführt sind die Standardabweichungen der basalen TF-Aktivität in mUnits pro 10^6 Zellen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgesetzt.

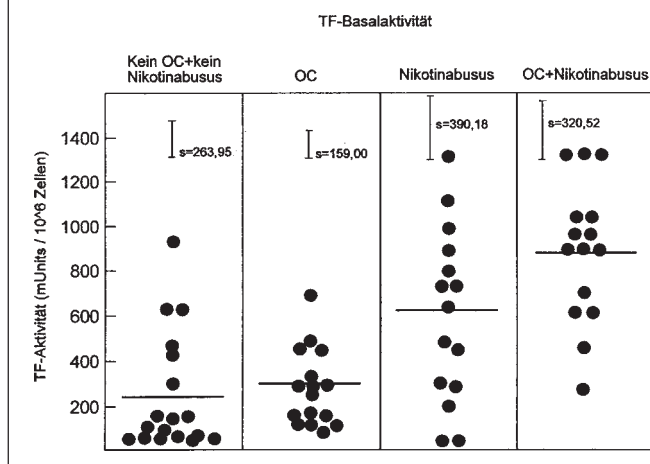
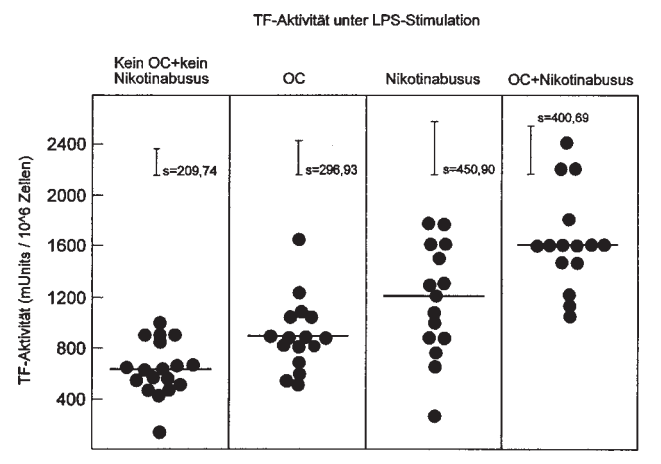


Abbildung 1B: Dargestellt ist die monozytäre TF-Aktivität nach 8 h LPS-Stimulation. Jeder Punkt repräsentiert die monozytäre TF-Aktivität der einzelnen Probandinnen der entsprechenden Gruppen: I. Keine orale Kontrazeption (OC), kein Nikotinabusus; II. Orale Kontrazeption, kein Nikotinabusus; III. Raucherinnen ohne orale Kontrazeption; IV. Raucherinnen unter oraler Kontrazeption. Die Linien stellen den Mittelwert der einzelnen Gruppen dar. Oben aufgeführt sind die Standardabweichungen der basalen TF-Aktivität in mUnits pro 10^6 Zellen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgesetzt. Blutmonozyten von Frauen unter oralen Antikonzeptiva zeigen nach 8 h LPS-Stimulation eine verstärkte TF-Aktivität im Vergleich zu Monozyten von Frauen ohne orale Antikonzeptiva. Raucherinnen unter oraler Kontrazeption zeigen die stärkste TF-Induzierbarkeit.



Monozytäre TF-Genexpression

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte TF-Expression bei Frauen unter OC und bei Raucherinnen mit einer verstärkten TF-Genexpression einhergeht, wurde die TF-mRNA mittels Reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Unstimulierte und LPS-stimulierte Blutmonozyten von Frauen unter OC und von Raucherinnen (mit oder ohne OC) zeigten eine verstärkte TF-

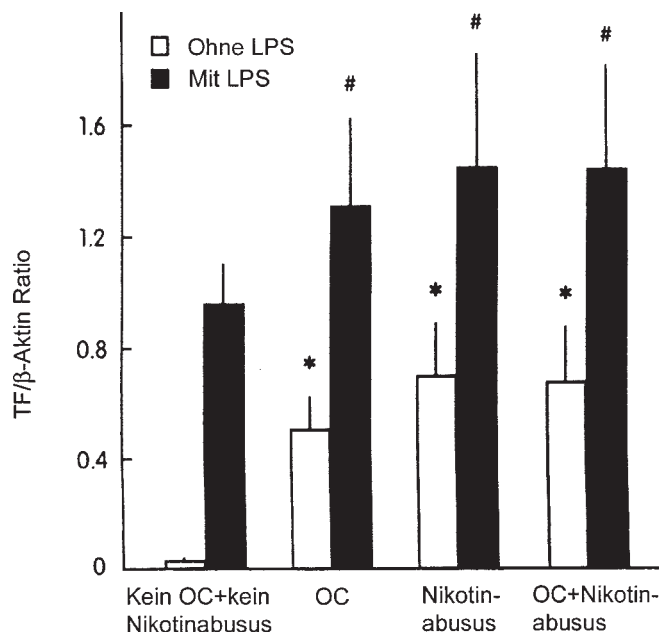
Genexpression im Vergleich zu Nichtraucherinnen ohne OC ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede in der TF-Genexpression fanden sich bei Nichtraucherinnen mit OC, Raucherinnen ohne OC und Raucherinnen mit OC (Abb. 2).

NF-κB-Aktivierung

Aufgrund der beobachteten Erhöhung der TF-mRNA-Expression in Monozyten von Frauen unter aktueller

OC-Einnahme wurde der Transkriptionsfaktor NF-κB, der für die TF-Genexpression in Monozyten maßgeblich verantwortlich ist, untersucht. In monozytären Kernextrakten von Frauen unter OC konnte eine gesteigerte NF-κB-Aktivität beobachtet werden (Abb. 3), wohingegen Monozyten von Frauen ohne OC eine deutlich reduzierte NF-κB-Aktivität aufwiesen. In Monozyten von Raucherinnen konnte ebenfalls eine erhöhte NF-κB-Aktivität festgestellt werden (Abb. 3).

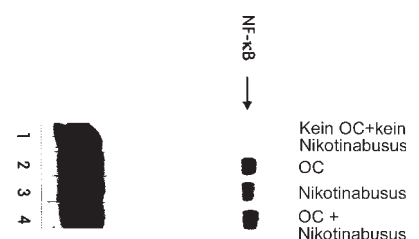
Abbildung 2: In Monozyten von Frauen unter aktueller oraler Kontrazeption (OC) und/oder bei Nikotinabusus zeigt sich eine erhöhte TF-Gen-Expression. Die TF-Gen-Expression wurde mittels RT-PCR in unstimulierten und stimulierten (LPS 10 µg/ml; 8 h) Monozyten von I. Frauen ohne OC, kein Nikotinabusus; II. Frauen unter OC, kein Nikotinabusus; III. Frauen ohne OC, Nikotinabusus; IV. Frauen unter OC und Nikotinabusus analysiert. Die TF-mRNA-Level wurden densitometrisch quantifiziert und durch die mRNA-Level des Kontrollgens β-Aktin normiert. Die Ergebnisse der TF-/β-Aktin-Ratio sind als Mittelwerte und deren Standardabweichung aufgeführt. * = $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen von Frauen ohne OC, kein Nikotinabusus; # = $p < 0,05$ verglichen mit stimulierten Zellen von Frauen ohne OC, kein Nikotinabusus. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den TF-mRNA-Level zwischen Frauen unter OC, kein Nikotinabusus; Frauen ohne OC, Nikotinabusus und Frauen unter OC und Nikotinabusus beobachtet. Die durchschnittliche TF/β-Aktin-Ratio in unstimulierten (stimulierten) Monozyten betrug $0,02 \pm 0,01$ ($0,96 \pm 0,11$) ohne orale Kontrazeption, kein Nikotinabusus; $0,49 \pm 0,08$ ($1,33 \pm 0,42$) unter oraler Kontrazeption, kein Nikotinabusus; $0,71 \pm 0,23$ ($1,42 \pm 0,81$) von Raucherinnen ohne orale Kontrazeption und $0,67 \pm 0,09$ ($1,39 \pm 0,51$) von Raucherinnen unter oraler Kontrazeption.



Zellkultur-Experimente

Um zu untersuchen, ob der Einfluß von OC auf die monozytäre TF-Expression durch einen direkten Hormoneffekt zustande kommt, wurden kultivierte Monozyten aus Buffy coats *in vitro* mit Estradiol inkubiert und die TF-mRNA-Expression und die NF-κB-Aktivität analysiert. Abbildung 4A zeigt ein Agarosegel-Profil der RT-PCR-

Abbildung 3: In Monozyten von Raucherinnen und Frauen unter oraler Kontrazeption wurde eine erhöhte NF-κB-Aktivierung beobachtet. Nukleare Extrakte wurden mittels EMSA unter Verwendung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden mit NF-κB-Konsensus-Sequenz analysiert. Es wurde die NF-κB-Bindungsaktivität in Blutmonozyten (ohne LPS-Stimulation) von Nichtraucherinnen ohne OC (Bande 1), von Nichtraucherinnen unter aktueller OC-Einnahme (Bande 2), Raucherinnen (Bande 3) und Raucherinnen unter aktueller OC-Einnahme (Bande 4) analysiert.



Daten von Monozyten, die mit 17 β -Estradiol (0,1–1000 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert wurden. Die TF-mRNA-Level wurden densitometrisch quantifiziert und durch die mRNA-Level des Kontrollgens β -Aktin normiert. In einem Inkubationsversuch mit 100 ng/ml Estradiol für 24 Stunden konnte eine TF-mRNA-Induzierung bis zum 67 \pm 14-fachen beobachtet werden. Die β -Aktin-mRNA-Level wiesen unter Stimulierung mit 17 β -Estradiol keine Veränderung auf. Um zu untersuchen, ob durch 17 β -Estradiol eine NF- κ B-Aktivierung mit gesteigerter TF-Gentranskription in Blutmonozyten erfolgt, wurden DNA-bindende Proteine aus nukleären Extrakten unter Verwendung von radioaktiv-markierten, NF- κ B-haltigen Oligonukleotiden mittels EMSA analysiert. Die 17 β -Estradiol-Stimulation führte in den monozytären Zellkulturen zu einer

konzentrationsabhängigen NF- κ B-Aktivierung (Abb. 5). Die Western Blot-Analyse des I κ -B α -Proteins zeigte eine Verminderung von I κ -B α in den Estradiol-behandelten Zellen (Abb. 5).

DISKUSSION

Bei prämenopausalen Frauen ist die TF-Aktivität von peripheren Blutmonozyten sowohl unter oraler Kontrazeption (OC) als auch bei Nikotinabusus erhöht. Der additive Effekt bei gleichzeitigem Nikotinabusus erklärt möglicherweise den synergistischen Effekt des Rauchens für das Risiko thromboembolischer Ereignisse unter OC-Einnahme.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß die Einnahme oraler Kontrazeptiva mit einem gesteigerten

thromboembolischen Risiko assoziiert ist [3, 7, 8, 22–24]. Dieses Risiko wird bei gleichzeitigem Nikotinabusus potenziert [5, 25–28]. Trotz intensiver Forschung ließ sich bis heute nicht endgültig klären, welche Mechanismen an der Pathogenese thromboembolischer Ereignisse bei jüngeren Frauen unter oraler Kontrazeption beteiligt sind.

Vaskuläre Hämostase ist abhängig von dem dynamischen Gleichgewicht des Gerinnungssystems und des fibrinolytischen Systems, die die intravaskuläre Thrombenbildung und Fibrinauflösung kontrollieren. Obwohl Monozyten durch ihre Fähigkeit, Tissue Factor (TF) zu exprimieren, in der Lage sind, die Gerinnungskaskade zu initiieren, wurde bisher noch nicht untersucht, ob die monozytäre TF-Expression prämenopau-

Abbildung 4A: Dargestellt ist der Effekt von 17 β -Estradiol auf die TF-Gentranskription in kultivierten humanen Blutmonozyten. Die monozytäre TF-mRNA wurde mittels RT-PCR ermittelt. Die Monozyten wurden für 24 h in Anwesenheit von 17 β -Estradiol in Konzentrationen von 0,1–1000 ng/ml inkubiert. Negative Kontrollen wurden routinemäßig durch PCR von Proben ohne 17 β -Estradiol durchgeführt. Abgebildet sind die PCR-amplifizierten Produkte von TF- und β -Aktin-mRNA.

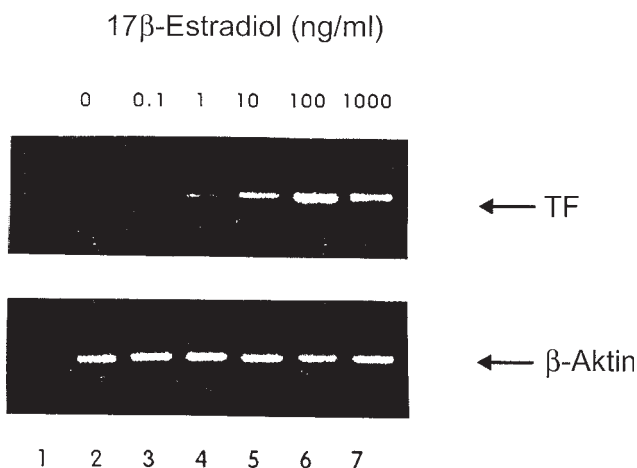
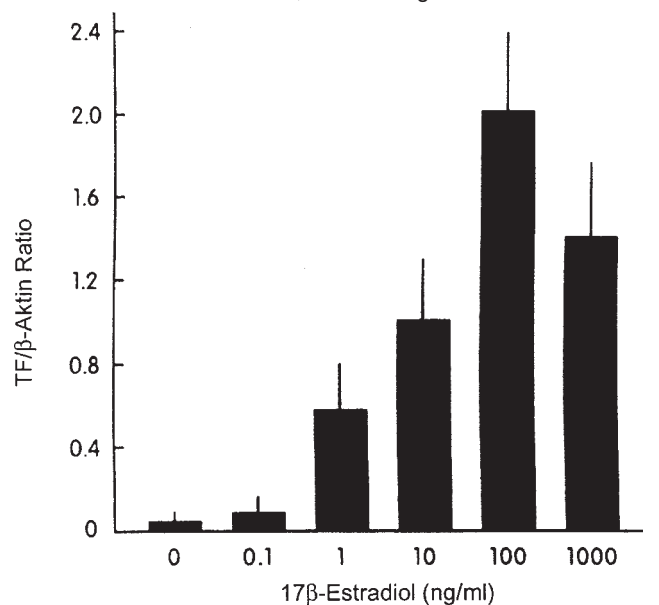


Abbildung 4B: Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von TF-mRNA-Werten von drei unabhängig voneinander laufenden Untersuchungen zusammengefaßt. Die Monozyten wurden für 24 h mit 17 β -Estradiol in Konzentrationen von 0,1–1000 ng/ml inkubiert.



saler Frauen durch die Einnahme oraler Antikonzeptiva oder Nikotinabusus beeinflusst wird.

In der vorliegenden Studie wurde die monozytäre TF-Expression prämenopausaler Raucherinnen und Nichtraucherinnen mit und ohne oraler Kontrazeption untersucht. Dabei konnte eine erhöhte TF-Expression in Monozyten von Frauen unter OC und Raucherinnen beobachtet werden. Die verstärkte Tissue Factor-Synthese in Monozyten von Frauen unter OC mit oder ohne *ex vivo*-Stimulation läßt annehmen, daß die Monozy-

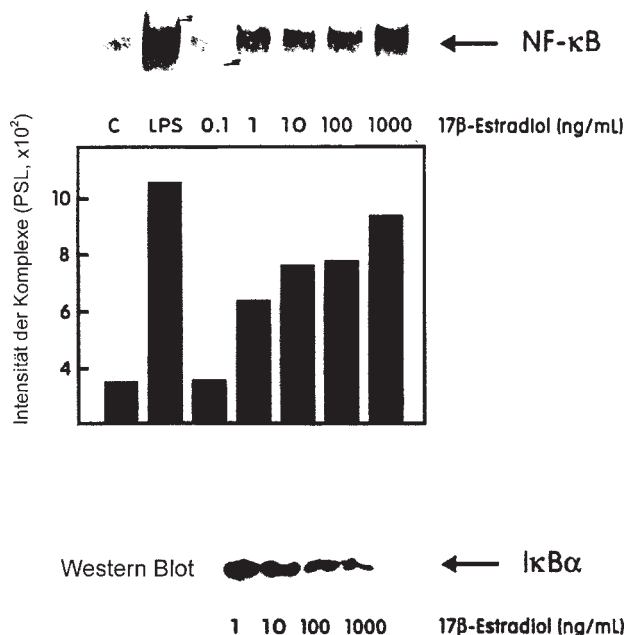
ten bereits vor der Zellisolierung *in vivo* aktiviert wurden. Diese Annahme wird durch eine gesteigerte TF-Gentranskription und eine erhöhte NF- κ B-Aktivierung in den Monozyten/Makrophagen unterstützt [29]. Der Mechanismus für die erhöhte TF-Aktivität ist noch unbekannt. Ein direkter Hormoneffekt erscheint möglich, da unter 17 β -Estradiol-Stimulation eine gesteigerte TF-Gentranskription und NF- κ B-Aktivität in den Monozyten nachgewiesen werden konnte. Ein Regulationsmechanismus der NF- κ B-Aktivierung stellt die Degradation von

I κ B α , dem Inhibitormolekül von NF- κ B, dar [30]. In der vorliegenden Studie konnte eine vermehrte Degradation von I κ B α unter Inkubation mit 17 β -Estradiol beobachtet werden. Obwohl indirekte Hormoneffekte nicht ausgeschlossen werden können, scheint die Anwesenheit von Estradiol zu einer NF- κ B-Aktivierung und dementsprechend zu einer gesteigerten TF-Gentranskription zu führen. Insbesondere der konzentrationsabhängige Effekt von Estradiol auf die TF-Aktivierung in Monozyten könnte in Zusammenhang mit der Korrelation von Östrogenkonzentrationen und dem Risiko für thromboembolische Ereignisse stehen [31].

Viele Studien, unter anderem die WHO-Studie von 1995, haben gezeigt, daß das Risiko venöser Thromboembolien von sogenannten Low-Östrogenen der dritten Generation mit den Progestagenkomponenten Desogestrel und Gestoden gegenüber Präparaten der zweiten Generation mit dem Progestagen Levonorgestrel um das zwei- bis dreifache erhöht ist [32, 33]. In der vorliegenden Studie konnten keine Unterschiede in der monozytären TF-Expression zwischen den oralen Antikonzeptiva der zweiten und dritten Generation festgestellt werden. Experimentell konnte anhand von Monozytenkulturen gezeigt werden, daß Progestagene keinen direkten Effekt auf die monozytäre TF-Expression haben. Möglicherweise ist die beobachtete Erhöhung der TF-Expression unter oraler Kontrazeption nicht direkt abhängig von der Konzentration und vom Typ des Progesterons.

Tissue Factor (TF), ein zellmembrangebundenes Glykoprotein, ist

Abbildung 5: Dargestellt ist der Effekt der monozytären NF- κ B-Aktivierung durch 17 β -Estradiol. Nukleare Extrakte von isolierten Monozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 17 β -Estradiol (0,1–1000 ng/ml) für 8 h inkubiert und durch EMSA, unter Verwendung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden mit NF- κ B-Konsensus-Sequenz (Bande 3–7), analysiert. Als positive Kontrolle wurden Monozyten mit LPS stimuliert (Bande 2). Die Protein-DNA-Komplexe wurden durch Elektrophorese auf 5%igen Polyacrylamidgelen getrennt. Die Position des NF- κ B-Komplexes im EMSA ist markiert. Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Analyse quantifiziert. I κ B α -Level aus zytosolischen Proteinextrakten wurden anhand von Western Blot bestimmt. Unter 17 β -Estradiol kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des I κ B α -Proteinlevels zytosolischer Extrakte mit gleichzeitigem Anstieg des Transkriptionsfaktors NF- κ B in nuklearen Extrakten. In drei voneinander unabhängigen Untersuchungen wurden gleiche Ergebnisse erzielt.



der wichtigste zelluläre Initiator der Gerinnungskaskade. Unter physiologischen Bedingungen wird TF nur von perivaskulären Zellen exprimiert [10, 11]. Monozyten sind die einzigen, im Blut zirkulierenden Zellen, die unter pathophysiologischen Bedingungen in der Lage sind, über TF-Expression die Gerinnungskaskade zu initiieren. Im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen und zellulären Immunantworten können Monozyten direkt durch eine Reihe von Stimuli wie Zytokine, Lymphokine, Endotoxine, Antigene und Komplementfaktoren zur TF-Synthese und -Expression aktiviert werden [10, 34, 35]. Diese pathologische TF-Expression wurde für verschiedene Krankheitsbilder wie Sepsis, Tumorleiden, Atherosklerose [9, 13, 36] u. a. verantwortlich gemacht und spielt möglicherweise auch in der Thrombogenese junger Frauen unter oraler Kontrazeption und/oder Nikotinabusus eine entscheidende Rolle. Da Monozyten durch Endotoxin zur TF-Synthese und -Expression induziert werden können, wurden die Monozytenkulturen in dieser Studie mit LPS stimuliert. Auch hier zeigte sich eine besonders starke Induzierbarkeit bei den Frauen, die rauchen und OC einnehmen.

In der Gruppe der Raucherinnen ließ sich eine deutlicher Anstieg der TF-Expression sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Monozyten feststellen. Da die monozytäre TF-Expression von Raucherinnen die von Nichtraucherinnen unter OC übertrifft, könnte dem Nikotinabusus im Vergleich zur OC-Einnahme ein stärkerer induzierender Effekt der TF-Aktivität zukommen als unter OC. Es ergibt sich jedoch keine

statistische Signifikanz zwischen der Gruppe der Raucherinnen und den Nichtraucherinnen unter OC. Der Mechanismus der monozytären TF-Aktivierung durch Nikotinabusus ist noch unklar. Eine mögliche Ursache für die verstärkte TF-Aktivierung in Blutmonozyten unter Nikotinabusus stellt oxidativer Streß dar [37, 38]. Zigarettenrauch setzt sich aus mehr als 400–500 Gaskomponenten zusammen, die große Mengen an freien Radikalen und oxidierten Vorstufen wie Phenole, Nitrosamine, NO, NO₂ etc. enthalten. In der partikulären Phase vorkommende lipophile Chinone werden reduziert, wobei als spezielle Oxidantien O₂ und H₂O entstehen, die ihrerseits zu reaktiven OH-Radikalen reagieren [39]. Intrazelluläre Oxidationen können die Transkription einzelner Gene erleichtern, wie z. B. die Transkription von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin 1 β , Interleukin 6 und Tissue Factor in humanen Monozyten [40–42]. Hierbei kommt es möglicherweise zur oxidativen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der maßgeblich an der Regulation der TF-Gentranskription beteiligt ist [43]. Möglicherweise sind Veränderungen im zellulären Redoxpotential für die gesteigerte NF- κ B-Bindungsaktivität in Monozyten von Raucherinnen verantwortlich. Andere Mechanismen wie Veränderungen der monozytären Zellmembran oder intrazelluläre Prozesse, die für die TF-Bildung notwendige mRNA- und Protein-Synthese, können für die erhöhte TF-Expression in Monozyten starker Raucherinnen verantwortlich sein.

Die höchste TF-Aktivität wurde in Monozyten von Raucherinnen

unter gleichzeitiger Antikonzeptiva-Einnahme beobachtet. Es zeigte sich jedoch keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Gruppe der Raucherinnen ohne OC-Einnahme. Ferner konnte kein weiterer Anstieg der TF-mRNA-Level beobachtet werden.

Sowohl Nikotinabusus als auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva erhöhen separat das Risiko venöser Thrombosen, Myokardinfarkte [26] und zerebrovaskulärer Insulte [5, 25]. Bei prämenopausalen Frauen ist die TF-Aktivität von peripheren Blutmonozyten sowohl unter oraler Kontrazeption (OC) als auch bei Nikotinabusus erhöht. Der additive Effekt bei gleichzeitigem Nikotinabusus und OC erklärt möglicherweise den synergistischen Effekt des Rauchens für das Risiko thromboembolischer Ereignisse unter OC-Einnahme [5, 25, 26]. Eine gesteigerte monozytäre TF-Expression könnte möglicherweise zur intravaskulären Gerinnungsaktivierung und eventuell zu thromboembolischen Komplikationen unter OC beitragen. Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, ob die monozytäre TF-Aktivität als ein prognostischer Marker für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse unter OC und Nikotinabusus herangezogen werden kann.

Literatur:

1. Vessey MP, Doll R. Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. *Br Med J* 1968; 2: 199–205.
2. Mammen EF. Oral contraceptives and blood coagulation: a critical review. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142: 781–90.
3. Stadel BV. Oral contraceptives and cardiovascular disease (first of two parts). *N Engl J Med* 1981; 305: 612–8.
4. Stadel BV. Oral contraceptives and cardiovascular disease (second of two parts). *N Engl J Med* 1981; 305: 672–7.

5. The Health Consequences of Smoking for Women: A Report of the Surgeon General. Office on Smoking and Health, Rockville, MD, 1980.
6. Bonnar MD. Coagulation effects of oral contraception. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1042–8.
7. Gevers Leuven JA, Klufft C, Bertina RM, Hessel LW. Effects of low-dose oral contraceptives on circulating components of the coagulation and fibrinolytic systems. *Lab Clin Med* 1987; 109: 631–6.
8. Inauen W, Baumgartner HR, Haerberli A; Straub PW. Excessive deposition of fibrin, platelets and platelet thrombin on vascular subendothelium during contraceptive drug treatment. *Thromb Haemost* 1987; 57: 306–9.
9. Osterud B, Flaestad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes patients with meningococcal infection: Related to an unfavorable prognosis. *Thromb Haemost* 1983; 49: 5–7.
10. Drake TA, Ruf W, Morrissey JW, Edgington TS. Functional tissue factor activity is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing cell line. *J Cell Biol* 1989; 109: 389–95.
11. Drake TA, Morrissey JW, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. *Am J Pathol* 1989; 134: 1087–97.
12. Nemerson Y. Tissue Factor and hemostasis. *Blood* 1988; 71: 71–8.
13. Rao LVM. Tissue factor as a tumor procoagulant. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 249–66.
14. Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, Vanheesbroucke C et al. Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation* 1994; 90: 1662–8.
15. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1963; 21 (Suppl. 97): 77–89.
16. Hölschermann H, Kohl O, Maus U, Dürfeld F, Bierhaus A, Nawroth PP, Lohmeyer J, Tillmanns H, Haberbosch W. Cyclosporine A inhibits monocyte tissue factor activation in cardiac transplant recipients. *Circulation* 1997; 96: 4232–8.
17. Altieri DC, Mannucci PM, Capitanio M. Binding of fibrinogen to human monocytes. *J Clin Invest* 1986; 159: 1042–57.
18. Hölschermann H, Dürfeld F, Maus U, Bierhaus A, Heidinger K, Lohmeyer J, Nawroth PP, Tillmanns H, Haberbosch W. Cyclosporine A inhibits tissue factor expression in monocytes / macrophages. *Blood* 1996; 88: 3837–45.
19. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA-isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.
20. Scarpati EM, Wen D, Broze G, et al. Human Tissue Factor: cDNA-sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987; 26: 5234–8.
21. Bierhaus A, Zhang Y, Deng Y, Mackman N, Quehenberger P, Haase, Luther T, Müller M, Böhrer H, Greten J, Eike M, Bauerle P, Waldherr R, Kiesel W, Ziegler R, Stern DM, Nawroth PP. Mechanism of the TNF α mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 26419–32.
22. Jespersen J, Petersen K, Skouby S. Effects of newer oral contraception on the inhibition of coagulation and fibrinolysis in relation to dosage and type of steroid. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 396–403.
23. Daly L, Bonnar J. Comparative studies of 30 μ g ethinyl estradiol combined with gestodene and desogestrel on blood coagulation, fibrinolysis, and platelets. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 430–7.
24. David JL, Gaspard UJ, Gillain D, Raskinet R, Lepot MR. Hemostasis profile in women taking low-dose oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 420–3.
25. Petitti DB, Wingerd J. Use of oral contraceptives, cigarette smoking and risk of subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 1978; 2: 234–6.
26. Rosenberg L, Kaufmann D, Helmrigh S, Miller D, Stolley P, Shapiro S. Myocardial infarction and cigarette smoking in women younger than 50 years of age. *JAMA* 1985; 253: 2965–8.
27. Royal College of General Practitioners. Oral contraception study: Further analyses of mortality in oral contraceptive users. *Lancet* 1981; 1: 541–6.
28. Shapiro S, Slone D, Rosenberg L, Kaufmann DW et al. Oral contraceptive use in relation to myocardial infarction. *Lancet* 1979; 1: 743–7.
29. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Fed Am Soc Exp Biol J* 1995; 9: 883–9.
30. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I κ B α proteolysis by site-specific, signal induced phosphorylation. *Science* 1995; 267: 1485–91.
31. Böttiger LE, Bomann G, Eklund G, Westerholm B. Oral contraceptives and thromboembolic disease: effects of lowering oestrogen content. *Lancet* 1980; 1: 1079–101.
32. Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myeres MW, Vasilakis C. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* 1995; 346: 1589–93.
33. World Health Organisation Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Effect of different progestagens in low oestrogen and contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet* 1995; 346: 1582–8.
34. Carlsen E, Flatmark A, Prydz H. Cytokine-induced procoagulant activity in monocytes and endothelial cells. Further enhancement by cyclosporine. *Transplantation* 1988; 46 (4): 575–80.
35. Gregory SA, Kornbluth RS, Helin H, Remold HG, Edgington TS. Monocyte procoagulant inducing factor: a lymphokine in the T-cell instructed monocyte procoagulant response to antigen. *J Immunol* 1986; 141: 3231–9.
36. Taylor FBJ, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K, Edgington TS. Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991; 33: 127–34.
37. Crutchley DJ, Que BG. Copper-induced tissue factor expression in human monocytic TPH-1 cells and its inhibition by antioxidants. *Circulation* 1995; 92: 238–43.
38. Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94: 6–9.
39. Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicologic implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111–26.
40. Weber C, Erl W, Peitsch A, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HWL, Weber PC. Anti-oxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor- κ B

mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated generate radicals. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1665–73.

41. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1866–74.

42. Eugui EM, DeLustro B, Rouhafza S, et al. Some antioxidants inhibit, in a coordinate fashion, the production of tumor necrosis factor- α , IL- β and IL-6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol* 1994; 6: 409–22.

43. Schreck R, Rieber P, Bauerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247–58.



Helma-Meta Terhalle

Geboren 1971 in Berlin. Studium der Humanmedizin von 1992 bis 1998 an der Universität Gießen. Ärztliche Vorprüfung 1995, erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1996, zweiter Abschnitt 1998, dritter Abschnitt 1999. 1996 bis 1999 Dissertation bei Prof. Dr. med. Tillmanns, Medizinische Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, Thema: „Die Tissue Factor-Aktivität ist unter oraler Kontrazeption und Nikotinabusus gesteigert“.

Korrespondenzadresse:

*Dr. med. Helma-Meta Terhalle
Franziskus-Hospital Harderberg
D-49124 Georgsmarienhütte,
Alte Rothenfelder Straße 23*

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)