

Araştırma Makalesi

Sıçan Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre Kültüründe Östrojenin Oluşturduğu RhoA Up-regülasyonu Üzerine ICI182,780, Progesteron ve Testosteronun Etkisi

The Effects of ICI182,780, Progesterone and Testosterone on Estrogen Induced Upregulation of RhoA Expressions in the Rat Coronary Microvascular Endothelium Cell Culture

Akif Hakan KURT¹, Rukiye Nalan TİFTİK¹, İsmail ÜN¹, Kansu BÜYÜKAFŞAR¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Bu çalışmada sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde tek başına estradiol ve estradiolün progesteron, testosteron ve östrojen reseptör α ve β blokörü ile kombinasyonlarının RhoA ekspresyonu üzerine etkileri Western blot analizi ile değerlendirildi.

Yöntem: Çalışmada Wistar türü sıçanlar kullanıldı. Kalpler Langendorff kalp perfüzyon sistemine asılarak koroner mikrovasküler endotel hücreleri elde edildi. Hücreler kültür flasksına ekilerek 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Konfluent olan flaskslar pasajlanarak çoğaltıldı. 3. pasaj koroner mikrovasküler endotel hücreleri, deneylerden 24 saat önce bölünmeleri durdurulup 17 β -estradiol (10⁻⁸ ve 10⁻⁷M) tek başına veya 17 β -estradiol testosteron (10⁻⁸ ve 10⁻⁷M), progesteron (10⁻⁸ ve 10⁻⁷M) ve ICI 182, 780 (10⁻⁵M), kombinasyonu ilave edilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flaskslardaki hücreler homojenize edilerek Western-Blot yöntemi ile RhoA protein enzim ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: 17 β -estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe progesteron ve testosteron ile bloke edilemeyen RhoA up-regülasyonu neden olmaktadır.

Sonuç: Sonuç olarak östrojene bağlı olarak gözlemlenen kardiyovasküler komplikasyonlardan Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonu sorumlu olabilir.

Anahtar Sözcükler: endotel; 17 β -estradiol; progesteron; rhoA; testosteron

Abstract

Aim: In this study, the possible effects of estrogen and its combinations with classical estrogen α and β receptor blocker ICI 182, 780, progesterone and testosterone hormones on the RhoA expressions in the rat coronary microvascular endothelium cell culture using were assessed by Western blott analysis.

Method: Wistar rats were used in the study. Coronary microvascular endothelial cells were obtained by the mounted rat hearts on a constant-flow Langendorff system. The cell suspensions were plated and incubated at 37°C under 5% CO₂. Confluent flasks were passaged. The third passage coronary microvascular endothelial cells were made quiescent 24 hours before experimentation. Next, it was incubated with either 17 β -estradiol (10⁻⁸ -10⁻⁷M), or its combination with ICI182, 780 (10⁻⁵M), progesterone (10⁻⁸ - 10⁻⁷M), and testosterone (10⁻⁸ - 10⁻⁷M) for 24 hrs. Afterwards, the cells in flasks were homogenized and RhoA protein enzyme expression levels were measured by Western-Blotting technique.

Results: 17- β estradiol causes RhoA up-regulation that can not be blocked by progesterone and testosterone in rat coronary microvascular endothelial cell culture.

Conclusion: Activation of Rho/Rho-kinase pathway might be responsible for the development of estrogen associated cardiovascular complications.

Keywords: endothelium; 17 β -estradiol; progesterone; rhoA; testosterone

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2011;4(2):17-21

Geliş Tarihi : 15.05.2012

Kabul Tarihi : 06.07.2012

Yazışma Adresi: Arş. Gör. Akif Hakan KURT

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı,

Çiftlikköy Kampüsü 33342-Mersin

Tel : 0324 3610001/1175

Faks : 0324 3412400

E-posta : farma1975@hotmail.com

Giriş

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar ve komplikasyonları en başta gelen ölüm nedenlerindedir. 30-50 yaş arası erkeklerde kardiyovasküler hastalık insidansı aynı yaştaki kadınlara göre daha fazladır (1). Bununla uyumlu bir şekilde koroner arter hastalıklarının, kadınlarda erkekler ile karşılaştırıldığında ortalama 10 yıl sonra geliştiği bildirilmiştir (2). Menopozla beraber kadınlarda kardiyovasküler hastalıklarda artma ve endotel fonksiyonlarında bozulma olmaktadır. Bu artmış risk estrogen tedavisi ile önlenabilir gibi görünmektedir (3). Ancak estrogenlerin bu kardiyovasküler koruyucu etkilerinin yanısıra hormon replasman tedavi süresince zararlı kardiyovasküler etkilerinin de ortaya çıktığı bildirilmiştir (1). Örneğin Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) çalışmasında ilk bir yıl içinde hormon replasman tedavisi alan grupta kontrol grubuna göre daha sık kardiyovasküler problemler gözlenmiştir (4). Plasebo kontrollü Papworth HT Atherosclerosis Study Enquiry (PHASE) çalışmasında 4. yılın sonunda estrogen tedavisi alan grupta koroner hastalıklar %23 oranında daha sık görülmüştür (5).

Progesteronlar, estrogen tedavisinin artırdığı endometriyal malignite riskini azaltmak için hormon replasman tedavilerine sıklıkla eklenmektedir. Ayrıca progesteron, estrogenlerin meydana getirdiği vasküler etkisini değiştirebilmektedir (6).

Başlıca erkek seks hormonu olan testosteron yüksek dansiteli lipoprotein (YDL) azalmasına ve trigliseritlerin artmasına yol açar (7). Testosteron direkt androjenik etkilerinin yanı sıra estrojene dönüşerek ateroskleroz gelişimini etkileyebilir (8).

Ateroskleroz gelişiminin ilk basamağının endotelial disfonksiyon olduğu düşünülmektedir (9). Sağlıklı bir endotel, kan ve damar duvarı arasında fizyolojik bir bariyer olmasının yanısıra çoklu endokrin ve parakrin fonksiyonları olan bir organ olarak da tanımlanmaktadır (10).

Damar endotel hücreleri, aynı düz kas hücresi gibi kontraktıl elementlere sahiptir. Dolayısıyla bu hücreler çeşitli stimuluslara yanıt olarak kontraktilete şeklinde yanıt verebilir. Rho benzeri küçük GTPaz olan RhoA, aktomyozin kasılmasını artırır ve bu şekilde intrasellüler kavşak bütünlüğünü bozarak endotelial bariyer disfonksiyonuna neden olur (11,12). Heterotrimerik G proteinleri ile kenetli çeşitli reseptörlerin aktive edilmesi, hücre içi Ca^{2+} düzeylerini artırabilir. Kalsiyum, kalmoduline bağlanarak miyozin hafif zincirini fosforile etmek için miyozin hafif zincir kinazı stimüle eder (13-15). Bu enzim miyozini fosforile ederek kasılma olayını başlatır. Diğer taraftan miyozin fosfataz deneni bir enzim de, miyozini defosforile ederek kasılma olayını tersine çevirir. Ca^{2+} duyarlaşmasındaki esas mekanizmanın miyozin hafif zincir kinazın stimülasyonundan farklı olarak, miyozin fosfotazın Rho-kinaz tarafından fosforile edilerek inhibe edilmesi olduğu ileri sürülmektedir (16,17).

Estrogenin *in vivo* olarak dişi sıçanların serebral dolaşımında vasküler Rho-kinaz fonksiyonlarını baskıladığı gösterilmiş olmasına rağmen, tavşan mesane düz kasında estrogenlerin Rho-kinaz (ROCK) ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı bildirilmektedir (18,19). Ayrıca insan

umbilikal ven endotel hücre kültüründe estrogenin ve progesteronun, Rho-kinazın alt efektörü olan moezinin fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir (20,21).

Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücresinde 17 β -estradiol'ün özellikle Rho (RhoA) ekspresyonu üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla tek başına estradiol ve estradiolün progesteron, testosteron ve estrogen reseptör α ve β blokörü ile kombinasyonlarının RhoA ekspresyonu üzerine etkileri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Koroner Mikrovasküler Endotel Hücre İzolasyonu ve Ekimi

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyle Hayvanları merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada Wistar türü 250-300 gram ağırlığında erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar dekapite edilerek toraksları açıldı. Aortaları mediastinal dokudan ayrılarak görünür hale getirildikten sonra kalpleri çıkarıldı. Perfüzyon işlemi için izole Langendorff kalp perfüzyon sistemi kullanıldı. Endotel hücre izolasyonu ve kültürü Ülker ve ark. (22) tarafından daha önce uygulanan yöntemlere göre hazırlanmıştır. İlaç inkübasyonu yapılacak flasklara bir gece önceden üremelerini durdurmak amacıyla Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)'li renksiz ve serum içermeyen besiyeri ilave edilmiştir. 17 β -estradiol (10^{-8} ve 10^{-7} M) tek başına veya 17 β -estradiol testosteron (10^{-8} ve 10^{-7} M), progesteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ve ICI 182, 780 (10^{-5} M) uygulandıktan 24 saat sonra flaskların mediumları alınmış ve daha sonra flasklar hücre sıyrıcı ile sıyrılıp hücrelerin mekanik olarak zeminden ayrılması sağlanmıştır. Hücreler homojenizatör yardımı ile homojenize edildikten sonra supernatantın 10^6 ar μ l'si Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılmıştır. Kalan proteinler ise Western-blot yöntemi için kullanılmıştır.

Western-Blot Analizi

Koroner mikrovasküler endotel hücrelerinden elde edilen protein karışımında hedef protein olan RhoA'nın varlığını göstermek amacıyla özel bir protein-protein hibridizasyon tekniği olan Western-Blotlama yöntemi kullanıldı. Eşit miktarlarda protein %10'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE)'e yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu. Jelde büyüklüklerine göre ayrılan ve bantlar oluşturan proteinler elektrotransfer tekniği ile nitrocelüloz bir membrana aktarıldı. RhoA (Santa Cruz Biotechnology) antikoruna ile 1 saat muamele edildi. Bu işlem sonrasında HRP (horseradish peroxidase) bağlı sekonder antikor ile (1:2000 dilüsyonda) yine bir saat muamele edildi. Daha sonra membranlar ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit (Amersham Biosciences, Freiburg Germany) görüntüleme solüsyonu ile 5 dakika karanlıkta bekletildikten sonra görüntüldü.

İstatistiksel Analizler

Western Blot tekniği ile elde edilen bantların analizi için Scion Image programından faydalandı. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirilme için ANOVA ve Dunnett post hoc testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

Bulgular

17- β Estradiol ve ICI 182,780 ile Kombinasyonunun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

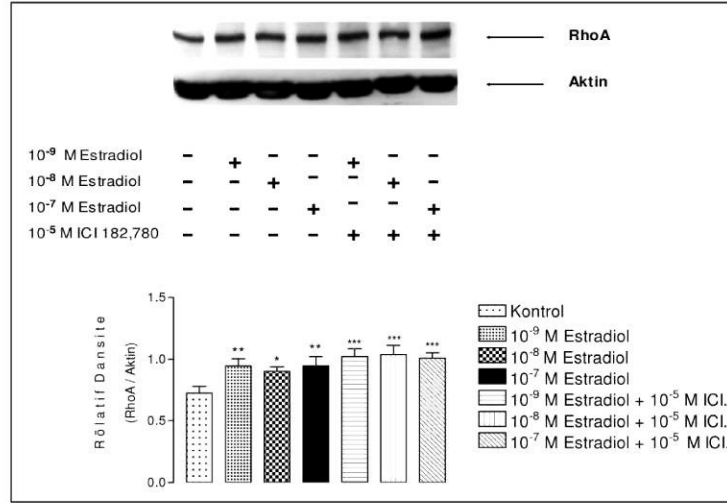
10^{-9} , 10^{-8} ve 10^{-7} M 17 β -estradiol, sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını artırdı, fakat bu artış konsantrasyon bağımlı değildi. Estrojen reseptör blokörü ICI 182, 780, estradiolün oluşturduğu RhoA protein ekspresyon artışını inhibe etmedi (Şekil 1).

17- β Estradiol ve Progesteron ile Kombinasyonunun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

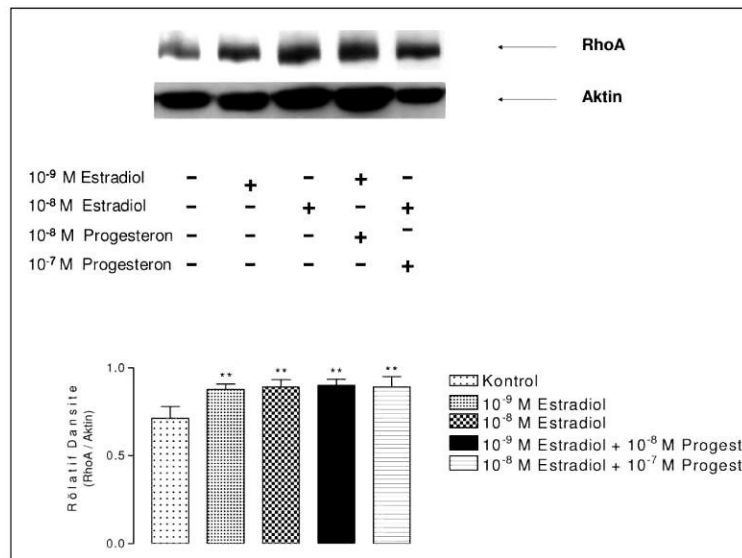
10^{-9} ve 10^{-8} M 17 β -estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdı, 10^{-8} ve 10^{-7} M progesteron bu etkiyi ortadan kaldırmadı (Şekil 2).

17- β Estradiol ve Testosteron ile Kombinasyonunun RhoA Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

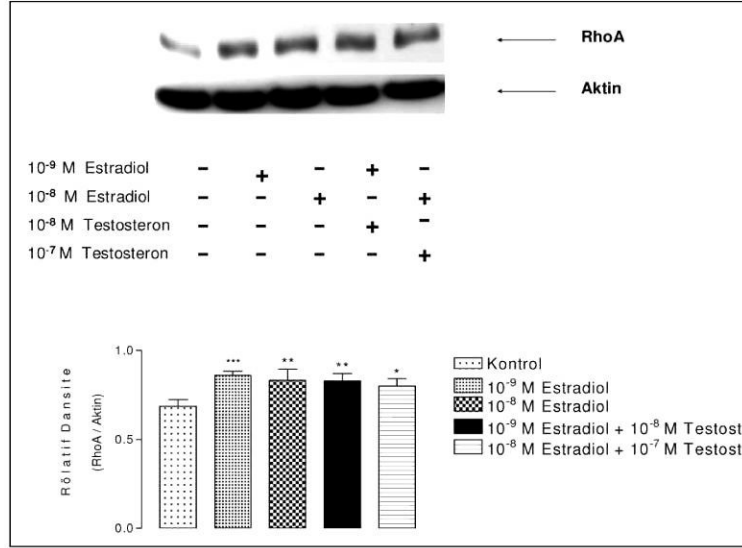
10^{-9} ve 10^{-8} M 17 β -estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücrelerinde RhoA protein ekspresyonlarını anlamlı olarak artırdı, 10^{-8} ve 10^{-7} M testosteron estradiolün oluşturduğu RhoA protein ekspresyon artışını inhibe etmedi (Şekil 3).



Şekil 1. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17- β estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M ve 24 saat, n=5) ve onun testosteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun 24 saat inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.



Şekil 2. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17- β estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M ve 24 saat, n=5) ve onun progesteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun 24 saat inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. **: p<0.01.



Şekil 3. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre homojenatlarında 17- β estradiol (10^{-9} ve 10^{-8} M ve 24 saat, n=5) ve onun testosteron (10^{-8} ve 10^{-7} M) ile kombinasyonunun 24 saat inkübasyonunu takiben RhoA protein ekspresyonlarının Western blot tekniği ile gösterilmesi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* test olarak Dunnet testi kullanılmıştır. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

Tartışma

Bu çalışmada estradiol tek başına ve estradiolün progesteron, testosteron ve estrogen reseptör α ve β blokörü, ICI 182,780 ile kombinasyonlarının Rho (RhoA) ekspresyonu ve Rho-kinaz aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı.

Yapılan pek çok klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda premenopozal kadınlarda aynı yaş erkek ve postmenopozal kadınlara göre kardiyovasküler hastalık insidansının daha düşük olduğu bildirilmektedir (23). Bundan dolayı, bu çalışmada sıçan koroner endotel hücre kültürlerinde seks hormonlarının (estrogen, testosteron ve progesteron) kardiyovasküler komplikasyonlara aracılık ettiği bugün iyi bilinen bir yolak olan Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizmaları (24) üzerine etkilerini inceledik. Her ne kadar androjenlerin sıçan renal arterinde Rho-kinaz (ROCK) ekspresyonunu ve aktivitesini stimüle ettiği (25) progesteronun insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe (HUVEC) Rho-kinazın alt efektorü olan moezinin fosforilasyonunu artırdığı (21) ve 17- β estradiolün ROCK ekspresyonunu ve fonksiyonunu baskıladığı bildirilmiş olsa da (18), bizim çalışmamızda tam tersine estradiol, RhoA ekspresyon ve aktivitesini artırmıştır. İlginç olarak bu *up*-regülasyon, estrogen reseptör blokörü ICI 182,780 ile inhibe edilemedi. Ayrıca pek çok dokuda estrogenin etkisini zayıflatan ve ona ters yönde hareket eden progesteron ve testosteron uygulaması da estradiolle indüklenen RhoA ekspresyon artışını baskılamadığı görüldü.

Bilindiği üzere Rho/Rho-kinaz sinyal ileti mekanizması vasküler sistemin tonüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Rho/Rho-kinaz yolağı hem damar düz kas kasılmasına katkı sağlamakta hem de inflamatuvar aterosklerotik lezyonların oluşmasına neden olmaktadır (24). Rho/Rho-kinaz yolağı ateroskleroz, koroner arter hastalığı, aritmi, hipertrofik kalp

yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir terapötik hedef olarak görülmektedir. Kalp damar sisteminde böylesi olumsuz etkisi olan bir yolağın iyi etkileri olduğu bilinen estradiol ile güçlenmesi ilk bakışta güncel bilgilerimizle pek bağdaşmamaktadır. Ne var ki, estrogenin hücre proliferasyonu için mitojenik bir ajan olduğu dikkate alınır, bu etkinin esasında koruyucu olabileceği düşünülebilir. Şöyleki; Brouchet ve ark. (26), estradiolün reendotelizasyonu estrogen reseptörü α (ER α) aracılığıyla artırdığını rapor etmişlerdir. Bu da, esasında estradiolün sadece kadın cinsel organlarında proliferatif olmadığı fakat aynı zamanda diğer doku ve hücreler için de mitojenik bir ajan olduğunu düşündürülebilir. Ancak etkinin estrogen reseptör blokörü (ICI 182,780) ile bloke edilmemesi bu olaya estrogen reseptörlerinin karışmadığını gösterebilir. Ya da bilinen estrogen reseptörü dışında başka bir reseptörün katkısı olabilir. Yahut estrogen reseptöründen bağımsız olarak direk bir şekilde RhoA ekspresyonunu artırmış olabilir. Bu etkinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Estrojenler bir taraftan Rho/ROCK yolağını da içine alan mekanizmalarla tümör hücre proliferasyonu ve migrasyonunu tetiklerken, aynı zamanda olasılıkla aynı yolaklar üzerinden endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi yararlı etkiler oluşturabilir. Endoteli hasarlanmış damar bölgesinde trombus oluşumu hızlanmakta ve vazokonstriksiyon gelişmektedir (27,28).

Sonuç olarak, estradiol sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe progesteron ve testosteron ile bloke edilemeyen RhoA *up*-regülasyonuna neden olmaktadır. Bu çalışmalar ışığında gelişen pek çok kardiyovasküler komplikasyonların Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonundaki artış ile ilgili olabileceği ileri sürülebilir. Rho/Rho-kinaz yolağının aktivasyonu spesifik olarak inhibe eden ajanların kullanılması bu patolojik durumların tedavisinde yararlı olabilir.

Kaynaklar

1. Koledova VV, Khalil RA. Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007;5(4):777-89.
2. Kublickiene K, Luksha L. Gender and the Endothelium. *Pharmacological Rep* 2008;60(1):49-60.
3. Rosano GM, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet* 1993;342(8864):133-41.
4. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998;280(7):605-13.
5. Angerer P, Störk S, Kothny W, Schmitt P, von Schacky C. Effect of oral postmenopausal hormone replacement on progression of atherosclerosis: a randomized, controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(2):262-8.
6. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(2):233-49.
7. Aydilek N, Aksakal M. Effects of testosterone on lipid peroxidation, lipid profiles and some coagulation parameters in rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005;52(9):436-9.
8. Heler RF, Jacobs HS. Androgens estrogen and coronary heart disease. *Br Med J* 1981;282(6262):438-9.
9. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
10. Rubio AR, Morales-Segura MA. Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. *Archives of Medical Research* 2004;35(1):1-11.
11. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 2002;39(5):187-99.
12. van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achekar ID, Zeeman S, Musters RJ, van Hinsbergh VW. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2332-9.
13. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;372(6503):231-6.
14. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-Proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol (Lond)* 2000;522(2):177-85.
15. Kamm KE and Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985;25:593-620.
16. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(1):32-9.
17. Swärd K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 2000;522(1):33-49.
18. Chrissobolis S, Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke* 2004;35(9):2200-25.
19. Lin AD, Levin RM, Kogan BA, Whitbeck C, Leggett RE, Kearns C, Mannikarottu A. Alteration of contractile and regulatory proteins in estrogen-induced hypertrophy of female rabbit bladder. *Urology* 2006;68(5):1139-44.
20. Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR. Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol* 2006;20(8):1756-71.
21. Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, Goglia L, Giretti MS, Genazzani AR, Simoncini T. Progestogens regulate endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod* 2008;14(4):225-34.
22. Ülker S, Çınar M, Bayraktutan U, Evinç A. Aprotinin impairs endothelium-dependent relaxation in rat aorta and inhibits nitric oxide release from rat coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 2001;50(3):589-96.
23. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation* 1997;96(7):2468-82.
24. Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, Kandabashi T, Eto Y, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res* 2001;51(1):169-77.
25. Song J, Kost CK Jr, Martin DS. Androgens potentiate renal vascular responses to angiotensin II via amplification of the Rho kinase signaling pathway. *Cardiovasc Res* 2006;72(3):456-63.
26. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* 2001;103(3):423-28.
27. Bath P, Gray LJ. Association between hormone replacement therapy and subsequent stroke: a meta analysis. *BMJ* 2005;330(7487):34.
28. Peverill RE. Hormone therapy and venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17(1):149-64.