

## **Előzmények**

Jelen pályázat témája a trombocita-dús vérrögök kialakulásával kapcsolatos, ez a folyamat egyrészt a fiziológiás hemosztázis során, másrészt pedig artériás trombusok létrejöttékor zajlik le. A két esemény közös tulajdonsága, hogy a trombociták gyorsan áramló vérből kell, hogy kitapadjanak egy trombogén felszínhez. A hemosztázis során fontos a trombusképződés megfelelő lokalizációja, hiszen az érfalsérülést el kell zárni, hogy a vérvesztés megálljon, viszont a rög nem károsíthatja a véráramlást olyan mértékben, hogy az az ér által ellátandó szövetek károsodásához vezessen. Ha tehát egy vérrög nem a megfelelő helyen jön létre, az vérzéshez vagy trombólizishoz vezethet. Munkánk kezdetekor már ismert volt, hogy in vitro modellekben, az ún. áramlási kamrákban a trombocita-dús vérrögök kialakulásának első lépése a trombociták kitapadása a trombogén felszínhez. Nagy nyírási sebesség esetén, amely a hemosztázis ill. artériás trombólizis hemodinamikai viszonyait modellezi, a trombociták csak immobilizált von Willebrand faktorhoz tudnak kitapadni, amely vagy már ott van a trombogén felszínen (mint pl. az érfal subendotheliális rétegében, in situ), vagy a plazmában keringő szolubilis von Willebrand faktornak kell először kikötődnie a felszínhez, és ezt követi a trombociták GpIb receptoron keresztüli kötődése a von Willebrand faktorhoz. Utóbbi esetben az érfalban található kollagéneket (főként az I. és III. típusú fibrilláris kollagéneket) tekintik azoknak a komponenseknek, amelyek pl. érfalsérüléskor exponálódnak, és a von Willebrand faktor hozzájuk kötődve indítja el az áramló trombociták kitapadását a sérülés helyén.

Munkánk közvetlen előzménye egy áramlási kamrában megfigyelt jelenség volt (1, 2). A modellben artéria keresztmetszetet citráttal antikoagulált teljes vérrel perfundáltunk 3350 s-1 nyírási sebességnél 1 percig, majd a kitapadt trombocitákat indirekt immunfluoreszcenciával detektáltuk. A trombocita adhéziót kvantitatívan úgy jellemtük, hogy meghatároztuk, hogy a teljes célfelszín hány százalékát borították trombociták. Az érfal különböző rétegei között jelentős különbséget találtunk, míg a külső, tunica adventitia 50-60 %-át trombociták borították, addig a középső, tunica media rétegnek csak kb. 1 %-át. A media réteg passzív felszínként való viselkedése nem a kollagén rostok hiányára volt visszavezethető, hanem hogy az itt található kollagénrostok nem kötik a von Willebrand faktort, és ezért a trombociták sem tudnak kitapadni. Az adventitiában található kollagénrostok trombogenitása pedig azok von Willebrand faktor-kötő képességének tulajdonítható (1). Ez az eredmény jól egybeesik azokkal a leírásokkal, ahol érsérülés helyén keletkező vérrögök morfológiáját írják le: ahogy az ér lumenét elhagyja a kifolyó vér, a trombocita-dús rögök a sérülés szájához az adventitia felől tapadnak, így a rög nem nő be az ér lumenébe és nem korlátozza a vérzés csillapodását

követően a normális véráramlást. Von Willebrand faktor-hiányos egyedekben a rög nem tapad a sérülés szájánál az adventitiához, és nem is tudja tartósan csillapítani a vérzést. A media rétegben található kollagén rostok trombogénitását kb. 10-szeresére tudtuk növelni, ha a metszeteket tripszinnel, egy szerin-proteázzal ill. kondroitináz ABC-vel, egy glukózaminoglikán (GAG)hasító enzimmal előkezeltük, és a trombogénitás növekedésének hátterében a kollagénrostok megnövekedett von Willebrand faktor-kötő képessége állt (2).

### **Kísérleti célok és megvalósításuk**

Jelen munkánkat így azzal a hipotézissel kezdtük, hogy a media rétegben a kollagén komplexben lehet egyéb extracelluláris mátrix komponensekkel, melyek a kollagén von Willebrand faktor-kötő helyeit lefedik, és ezek a kötőhelyek a kölcsönhatásban álló komponensek módosításával exponálhatók, és így a réteg trombogénitása fokozható.

I, Fő kísérleti célunk az volt, hogy az érfalból olyan mátrix komponenst izoláljunk, amely gátolja a kollagén trombogén felszínként való viselkedését, és működése megfelel az eredeti, in situ artéria keresztmetszeten talált megfigyeléseknek. Mivel mind proteázzal, mind GAG-liázzal trombogénné tudtuk tenni a media réteget, az izoláció során más szövetekre leírt proteoglikán izolálási protokollokat adaptáltunk, és jellemeztük az egyes proteoglikán frakciók antitrombotikus funkcióját. Összesen három funkcionális tesztet állítottunk be, és ezekben vizsgáltuk a proteoglikánokat:

1, *von Willebrand faktor-dependens trombocita adhézió az áramlási kamrában*: adhéziós célfelszín úgy készítettünk, hogy az adventitia-ból készített kollagén-gazdag kivonatot dialízissel neutralizálva kollagén polimerizáció indítottunk meg, és a keletkező kollagénrostokat centrifugálással összegyűjtöttük és beágyazás után ugyanúgy metszettük, mint az artériákat. Az így létrehozott felszín kollagén-dús (ezt Masson Trichrome festéssel igazoltuk), és a natív adventitiához hasonló trombogénitással rendelkezik. A vizsgálandó proteoglikánokat a dialízis kezdetekor adtuk az adventitia kollagénhez. A trombocita adhéziót a célfelszínhez korábban általunk leírt módszerrel áramlási kamrában vizsgáltuk (1).

2, *von Willebrand faktor kötődése kollagén felszínhez, ha a felszín a proteoglikánt koprecipitálva tartalmazza*: 96-lyukú microplate-eket borítottunk I. vagy III. típusú kollagénnel, majd blokkolás után normál plazmával inkubáltuk. A kikötődött von Willebrand faktort indirekt ELISA-szerű módszerrel detektáltuk. A vizsgálandó proteoglikánt a kollagén felszín létrehozásakor adtuk a rendszerhez.

3, von Willebrand faktor kötődése kollagénhez szolubilis proteoglikán jelenlétében: Az előző pontban leírt, csak kollagénnel borított microplate-eket normál plazmával inkubáltuk és a kikötődött von Willebrand faktort indirekt ELISA-szerű módszerrel detektáltuk. A vizsgálandó proteoglikánt szolubilis formában a plazmához adtuk hozzá.

Az izolálás során a proteoglikán frakciókat fehérje és GAG tartalmukkal jellemeztük, immunológiai módszerekkel (dot-blot, ELISA) vizsgáltuk, hogy tartalmazznak-e bizonyos ismert proteoglikánokat. A funkcionális szempontból érdekesebbeket vizsgáltuk továbbá SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel, Western blottal és az izolált core fehérjéket triptikus peptidok tömegspektrometriás analízisével is azonosítottuk. Mivel a media és az adventitia réteg trombogenitása, in situ, jelentős különbséget mutatott, az izolálást a két rétegből külön-külön, de analóg módon végeztük, hogy felderítsük a két réteg feltehetően eltérő proteoglikán összetételét.

#### *Proteoglikánok immunlokalizációja az érfal egyes rétegeiben*

Irodalmi adatok alapján az érfal proteoglikánjainak (PG) többségét a perlecan, egy heparan-szulfát PG, a versican, egy nagy méretű, több kondroitin szulfát láncot hordozó PG, ill. két un. kis méretű Leu-gazdag proteoglikán, a decorin és a biglycan teszi ki, ez utóbbiak kondroitin szulfát/dermatán szulfát láncokat hordoznak (1 ill. 2 darab láncot, rendre). Ezeket a proteoglikánokat főként immunlokalizációs módszerekkel mutatták ki az érfalban, de sajnos, feltehetően a használt antitesttől függően, eltérő térbeli eloszlásokat találtak.

Az általunk használt antitestekkel kapott indirekt immunfluoreszcencián alapuló immunlokalizáció az alábbi eredményt adta:

perlecan a media rétegben és az adventitia vasa vasorumában,  
decorint az adventitia rétegben, kisebb intenzitással a media rétegben,  
biglycant főleg a mediában, kisebb intenzitással az adventitiában,  
versicant pedig kis intenzitással a mediában detektáltunk

#### *Az antitrombotikus matrix proteoglikán izolálásával kapcsolatos eredményeink:*

1, Az adventitia rétegből származó proteoglikánok egyik funkcionális tesztben sem gátolják a kollagén felszínek trombogenitását

2, A media rétegből izolált perlecan mindhárom funkcionális tesztben gátolja a kollagén trombogenitását, adventitiából perlecan nem izolálható.

A media guanidin HCl-os extraktumát Q-Sepharose oszlopon ioncserélő kromatográfiával fracionáltuk, NaCl gradiens elúció során a proteoglikán csúcs eleje tartalmazta a perlecan,

azonosítása a frakciókból dot-blottal, ill. Western blottal történt. A natív ill. kondroitináz ABC-vel, heparitinázzal kezelt proteoglikán SDS-PAGE analízise alapján a proteoglikán heparan-szulfát láncokat hordoz, a core-fehérje aminosavszekvenciája alapján is a perleccannal azonos. Az adventitia rétegből hasonló eljárás során nem találunk perlecan-pozitív proteoglikán frakciót.

A perlecan bazal membrán proteoglikánként közismert, jelentős előfordulása az érfal media rétegében nem volt ismert.

A funkcionális tesztekben a perlecan kb 50 %-kal csökkentette a trombocita adhéziót, a von Willebrand faktor kollagénhez való kötődése 60 %-kal csökkent, ha a kollagént perleccannal koprecipitáltuk, és a gátló hatás a felszín heparitináz kezelése után is 50 % maradt. Ez utóbbi eredmény arra utal, hogy az antitrombotikus hatásért a perlecan core fehérje része a felelős, és egybehangzik azzal az eredeti megfigyeléssel, hogy az artéria keresztmetszetek heparitináz kezelése nem fokozta a media réteg trombogénitását (2). A perlecan a plazmához adva is 20 %-kal csökkentette a von Willebrand faktor kötődését kollagénhez, a gátlás már 0.5 mg/l koncentrációnál elérte ezt a maximumot (ez megegyezik a rendszerben a von Willebrand faktor koncentrációjával).

3, A media rétegből izolált biglycan/decorin frakció antitrombotikus, míg az adventitia rétegből hasonló módon izolált decorin/biglycan frakciónak nincsen gátló hatása a funkcionális tesztekben.

A Q-Sepharose oszlopról eluált proteoglikán frakciókat egyesítettük (a media esetében a perlecan különválasztása után), és egy második ioncserélő kromatográfiát végeztünk DEAE-Sepharose oszlopon, NaCl gradiens elúcióval. Inhomogén csúcsot kaptunk, melyet ELISA-teszt alapján decorin-pozitív (a csúcs elején) és versican-pozitív frakciókra osztottunk.

A funkcionális tesztekben a versican-pozitív frakciók (adventitia ill. media eredetű) és az adventitia eredetű decorin-pozitív frakciók nem mutattak gátló hatást, a media decorin-pozitív frakciók viszont igen. A trombocita adhézió vizsgálatok az adventitia kollagén felszín trombocitákkal való fedettsége media decorin-pozitív frakció koprecipitálásakor a kontroll 40 %-ról 3.6 %-ra csökkent, tehát megközelítette a natív media réteg kb. 1 %-os fedettségét. Ha ugyanezt a frakciót kollagénnel koprecipitáltuk, a plazma von Willebrand faktor kötődése 35 %-kal csökkent, a proteoglikán gátló hatása a felszín kondroitináz ABC-vel való előkezelésével megszűnt, ami arra utal, hogy a proteoglikán GAG lánca fedi el a kollagén von Willebrand faktor-kötő helyeit.

A media decorin-pozitív frakciót és a funkcionális tesztekben inaktív adventitia decorin-pozitív frakciót SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel is vizsgáltuk. Az adventitia

proteoglikán frakció két komponenst tartalmazott, melyek molekulatömegük alapján megfelelnek az irodalomban leírt decorinnak (120 kDa) és biglycannak (200), heparitináz kezelés nem változtat a molekulatömegükön, kondroitináz ABC kezeléssel viszont egy kb. 48 kDa core fehérjét kapunk, ami szintén megfelel az irodalmi adatoknak. A core fehérje Western bloton decorin-pozitív, és a core fehérje köteg az aminosavszekvencia analízis alapján decorint és biglycant is tartalmaz. A decorin és biglycan szétválasztását hidrofób kromatográfiával végeztük Octyl-Sepharose oszlopon guanidin HCl gradiens elúcióval. ELISA-teszt alapján a decorin eluálódik először, és a biglycan a magasabb guanidin HCl koncentrációval, ami megfelel az irodalomban közölt szétválásnak. Az adventitia rétegben mennyiségileg a decorin dominál, a biglycan kevesebb. A media rétegből származó decorin-pozitív frakcióban lévő proteoglikánok elektroforetikus mobilitása lényegesen kisebb, de kondroitináz ABC kezelést követően szintén 48 kDa core fehérje köteget kapunk, a heparitináz nem változtatja meg a látszólagos molekulatömeget. A core fehérje köteg aminosavszekvencia analízis alapján decorint és biglycant is tartalmaz, a kettő szétválasztása Octyl-Sepharose oszlopon azt mutatja, hogy ebben a rétegben viszont a biglycan a fő komponens, és kevés a decorin. A media rétegből származó decorint és biglycant kollagénnel koprecipitálva külön-külön is gátolják a von Willebrand faktor kötődését kollagénhez, és a gátló hatás a GAG láncok eltávolításával szinte megszűnik. Kondroitináz ABC-vel előkezelt biglycannak viszont nincs gátló hatása, ha kollagénnel koprecipitáljuk. Ha a proteoglikánokat a plazmához adjuk, mind a media decorin, mind a media biglycan gátolják a von Willebrand faktor kötődését kollagénhez, a kondroitináz ABC-vel előkezelt proteoglikánok viszont hatástalanok.

SDS-PAGE alapján mind az adventitia, mind a media eredetű decorin ill. biglycan főként dermatán szulfát láncokat hordoz, mert kondroitináz B-vel kezelve a core fehérjénél alig nagyobb molekulatömegű kötegeket kapunk. Az, hogy a media biglycan/decorin antitrombotikus, és a hatásért a főként dermatán szulfát láncok a felelősek, egybehangzik az eredeti megfigyeléssel, ahol az artéria keresztmetszet kondroitináz ABC-vel történő kezelése 10-szeresére növelte a media réteg trombogénitását, a kondroitináz AC kezelés hatása viszont sokkal kisebb volt (2). Az adventitia rétegből származó decorin és biglycan ugyan szintén főként dermatán szulfátot hordoz, de látszólagos molekulatömegük lényegesen kisebb, ami magyarázhatja, hogy miért nem befolyásolják a kollagén trombogénitását.

Az irodalomban ismertek olyan leírások, ahol ugyanaz a proteoglikán core fehérje különböző sejtekben eltérő módon glikanálódott, de ugyanabban a sejt típusban is változhat a GAG láncok mérete különböző körülmények között. Különösen jól kapcsolható eredményeinkhez az a

korábbi irodalmi adat, hogy egy 48 kDa core fehérje vaszkuláris simaizom sejtekben hosszabb GAG láncot kapott, mint bőr fibroblaszt sejtekben, hiszen az érfal rétegei közül a media réteg extracelluláris matrixát a simaizom sejtek, míg az adventitia rétegét a fibroblasztok termelik.

Sikerült tehát az érfal media rétegéből két antitrombotikus proteoglikán komponenszt izolálni, a perlecant, ill. a kis Leu-gazdag proteoglikánok családjába tartozó biglycant/decorint. Az adventitia perlecant nem tartalmaz, a decorin/biglycan pedig feltehetően a media-tól eltérő, kisebb GAG láncok miatt nem gátolja a kollagén trombogenesisét. Az antitrombotikus proteoglikánok nem csak kollagénnel koprecipitálva teszik a felszínt antitrombogénné, hanem plazmához adva szolubilis formában is gátolják a kollagén von Willebrand faktor-kötő képességét.

Ezen eredményeinket konferencián több részletben mutattuk be (Komorowicz E; Wohner N; Keresztes Zs; Kovalszky I; Fass DN; Machovich R: *Az érfal szerkezetének és trombogenesisének összehasonlító vizsgálata*, MBA 56 (Suppl):34, 2003, Komorowicz E; Wohner N; Machovich R; Fass DN: *Az artériák media rétegéből izolált proteoglikánok gátolják a von Willebrand faktor kötődését kollagénnel*, MBA 58 (Suppl 2):24, 2005), a folyóiratcikk elkészítésével sajnos sokat csúsztunk témavezető gyermekvállalása miatt, így jelenleg még a társszerzőkkel egyeztetünk.

#### *Az eltérő trombogenesisű kollagén struktúrák morfológiai vizsgálata*

Az MTA Központi Kémiai Kutatóintézet munkatársa, Keresztes Zsófia végzett atomerőmikroszkópos méréseket az artériakeresztmetszet media ill. adventitia rétegének kollagén struktúrájával kapcsolatban natív ill. ecetsavas kezelést követő állapotban. Ezeken más szövetekben proteoglikánként leírt struktúrákat találtunk, de részletesebb vizsgálatokra már sajnos nem volt lehetőségünk, mert mire a proteoglikánok izolálását beállítottuk (2004 vége), Keresztes Zsófia szülési szabadságra ment, 2006-ban ismét szült, és 2007 végén tért vissza dolgozni. A kollagén/proteoglikán koprecipitátumok vizsgálatát ezért csak a közeljövőben tudjuk ismét folytatni.

II. Második fő kísérleti célunk az volt, hogy megállapítsuk, módosulhat-e különböző körülmények között az artériafal rétegeinek trombogenesisa.

Ezzel kapcsolatban megállapítottuk, hogy a hemosztázis aktivációjakor keletkező proteázok, mind a trombin, mind pedig a plazmin növelik a media réteg trombogenesisét, miközben az adventitia trombogenesisa nem változik. A hatás proteolízis következménye, hiszen szerin-

proteáz gátlókkal felfüggeszthető (Komorowicz E; Wohner N; Keresztes Zs; Kovalszky I; Fass DN; Machovich R: *Az érfal szerkezetének és trombogénitálásának összehasonlító vizsgálata*, MBA 56 (Suppl):34, 2003). Wohner Nikolett TDK-s hallgatóként kezdte el ezeket a vizsgálatokat, majd orvostanhallgatóként számos külföldi gyakorlaton vett részt, így kísérleti munkáját 2006 őszétől folytatta ismét. Azóta kimérte, hogy a neutrofil granulociták által szekretált MMP-8 és MMP-9 mátrix metalloproteázok is fokozzák az érfal media rétegének trombogénitását, továbbá az érfal neutrofil granulocitákkal való előkezelése is, széles spektrumú szerin-proteáz gátlószer jelenlétében is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az érfal media rétegének eredetileg antitrombogén struktúrája patológiás körülmények között, pl. gyulladás, érfalsérülés fokozódhat, tehát az érfal lokális trombogénitása hely és körülmény-függő módon is szabályozódhat (Wohner N; Komorowicz E; Kolev K: *Study of the structural determinants of arterial vessel wall thrombogenicity*, J Thromb Haemost 5 Suppl 2:P-T-414, 2007, Wohner N; Komorowicz E; Wu-Hen-Chang Vanda; Machovich R; Kolev K: *Az érfal trombogénitálásának strukturális vizsgálata*, MBA 60 (Suppl 2):12, 2007), a folyóirat cikk elkészítése folyamatban van.

Ezen vizsgálatok másik aspektusaként ateroszklerotikus erek proteoglikán komponenseit is szeretnénk volna vizsgálni, ehhez az anyaggyűjtést 2006-ban el is kezdtük, de témavezető 2006 elején szült, és ez megakasztotta a kísérleti munkának ezt a részét.

#### *A von Willebrand faktor kölcsönhatása a fibrinolitikus rendszerrel*

Mint azt a 2005. évi részjelentésben jeleztem, 2004-ben problémák támadtak az erek beszerzését illetően, így Tanka-Salamon Anna, aki biológus hallgatóként 2004 őszén csatlakozott munkacsoportunkhoz, más témát kellett, hogy válasszon diplomamunkájához, melyet végzése után PhD hallgatóként tovább folytatott laboratóriumunkban.

A von Willebrand faktor az artériás trombusok keletkezésének nem csak az első lépésénél játszik szerepet, hanem adhéziós molekulaként a trombocita-trombocita kölcsönhatásokban is, és a nyírási sebesség növekedésével nő a relatív szerepe a trombociták összetartásában.

Hagyományosan a fibrinogént tekintettük a trombocita aggregátumokat összetartó molekulának, de mint kiderült, csak a fibrinogén csak alacsony nyírási sebességek mellett elegendő ehhez a funkcióhoz. Mivel munkacsoportunknak sok éves tapasztalata van a trombolízis vizsgálatában (3, 4), azt kezdtük vizsgálni, a von Willebrand faktor jelenlétében vajon módosul-e a fibrinolitikus rendszer működése. E témában a következő eredményeket értük el:

1, A von Willebrand faktor védi a fibrinogént a plazmin, miniplazmin, microplazmin, és elasztáz általi degradációval szemben. Legrészletesebben a plazminnal való kölcsönhatásokat vizsgáltuk, a miniplazmin a plazmin első négy kringle doménjének lehasításával, a microplazmin pedig mind az öt kringle domén lehasításával jön létre, a miniplazmin fiziológiásan is előfordulhat, a microplazmint csak szerkezet-funkciós vizsgálatokhoz használják.

A fibrinogén degradációját az alábbi módszerekkel követtük: SDS-poliakrilamid gélelektroforézis, fibrinogén trombinnal való alvaszthatóságának elvesztése a degradáció következtében, etanol-szolubilis fibrinogén degradációs termékek időbeli keletkezése, ez utóbbi módszer alkalmas az enzim szubsztát iránti affinitásának ( $K_m$ ) ismeretében az enzim reakcióra vonatkozó  $V_{max}$  értékének számítására is (4). Valamennyi módszerrel megfigyelhető volt, hogy von Willebrand faktor jelenlétében a fibrinogén plazmin általi degradációja lassul, eközben a plazmin fibrinogénre vonatkozó  $K_m$  értéke nem változik, a  $V_{max}$  érték pedig a von Willebrand faktor koncentrációjának növelésével csökken, a gátlás non-kompetitív modellt követ, az inhibitoros állandó kb. megegyezik a von Willebrand faktor fiziológiás plazma koncentrációjával, így biológiailag is jelentős hatásról lehet szó. A gátlás mechanizmusának vizsgálva megállapítottuk, hogy a miniplazmin és a microplazmin is hasonló gátló hatással rendelkeztek, így a plazmin szerin-proteáz doménje lehet a felelős a kölcsönhatásért. Mivel a plazmin bontja a von Willebrand faktort is, felmerült, hogy az szubsztrátként kompetál a plazminért. A feltevésnek ellentmond, hogy a von Willebrand faktor jelenlétében semmilyen tesztelt körülmények között sem változott meg a plazmin aktivitása kis molsúlyú peptid szubsztráton, nem változott meg a fibrinogénre vonatkozó  $K_m$  értéke, továbbá a plazmin-von Willebrand faktor kötődést jellemző  $K_d$  érték hasonló volt mind a plazminogén, mind pedig aktív centrum-blokkolt plazmin  $K_d$  értékéhez. A von Willebrand faktor plazmin általi degradációját Western blottal követtük, és azt találtuk, hogy von Willebrand faktor és fibrinogén együttes jelenlétekor a fibrinogén degradációja már akkor is lassul, amikor a von Willebrand faktor molekulatömege még nem változik meg. Ennek degradációja nagyobb plazmin koncentrációk és hosszabb inkubációs idők esetén figyelhető meg jól.

Artériás trombusban a fibrinogén kb. 50 %-a alakul fibrinné, ennek plazminnal ill. miniplazminnal történő degradációját a von Willebrand faktor nem befolyásolja.

Ezen eredményeinket konferencián mutattuk be (Salamon A, Kolev K, Machovich R, Komorowicz E: *A von Willebrand faktor kölcsönhatásai a véralvadási és fibrinolyticus*



*rendszer egyéb molekuláris komponenseivel*, MBA 58 (Suppl 2):39, 2005), a közlemény elkészítése már folyamatban van.

A pályázatunk témájához kapcsolódik még egy megjelent könyvfejezet (Komorowicz E; Kolev K: *A kötőszövet elemei*, pp.266-277 in:Mandl J, Machovich R. Orvosi Patobiokémia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2007), és egy már elfogadott review cikk (Wohner N: *Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution*, CURR MED CHEM CARDIOVASC HEMATOL AGENTS, 6: in press, 2008 ), valamint témavezető 2005 elején sikeresen megvédett diplomamunkája is a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Villamosmérnöki Karán, Egészségügyi mérnök szakon (Komorowicz Erzsébet: Trombocita funkció vizsgálata és a vizsgáló módszer minősítése).

#### Referenciák

1. Komorowicz, E, McBane, RD, Charlesworth, J, Fass, DN. Reduced high shear platelet adhesion to the vascular media: Defective von Willebrand factor binding to the interstitial collagen. **Thromb Haemost**, 87: 763-70, 2002
2. Komorowicz, E, McBane, RD, Fass, DN. Physical and enzymatic perturbation of the architecture of the tunica media destroys its inherent thromboresistance. **Thromb Haemost** 88: 827-33, 2002
3. Kolev K, Komorowicz E, Owen WG, Machovich R: Quantitative comparison of fibrin degradation with plasmin, miniplasmin, neutrophil leukocyte elastase and cathepsin G **Thromb Haemost** 75:140-146, 1996
4. Komorowicz E, Kolev K, Machovich R: Fibrinolysis with des-kringle derivatives of plasmin and its modulation by plasma protease inhibitors. **Biochemistry**, 37:9112-9118, 1998

Mivel a kitűzött fő kísérleti célokat sikerült megvalósítani, de az eredmények referált folyóiratban 3 cikk formájában való közlése témavezető és több résztvevő szülei miatt még folyamatban van, kérem, hogy a zsűri két év múlva végezze el a pályázat végleges minősítését.