

Marta Michalska

ODDZIAŁYWANIE FIBRYNY ZE ZWIĄZKAMI RTĘCI,
ANGIOGENNYMI CZYNNIKAMI ORAZ
Z NOWOZSYNTETYZOWANYMI ZWIĄZKAMI
FOSFOHYDRAZONOWYMI
POCHODNYMI CHROMONU I KUMARYNY
CZ. II. BADANIA WŁASNE

Zakład Biochemii Farmaceutycznej Katedry Chemii Farmaceutycznej
i Biochemii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. *M. Mirowski*

Hasła kluczowe: fibryna, angiogeneza, pochodne chromonu i kumaryny, nośniki czynników wzrostu (scaffolds).

Key words: fibrin, angiogenesis, derivatives of chromone and coumarin, scaffolds.

Prowadzono badania nad wykorzystaniem fibryny jako nośnika czynników angiogennych. Zastosowanie fibryny do wytwarzania scaffoldu musiało być poprzedzone licznymi badaniami układu krzepnięcia, szczególnie fibryny *in vitro*, *ex vivo* na zwierzętach oraz ludziach. Badania dotyczyły:

- 1 – ogólnej charakterystyki parametrów krzepnięcia (badania na szczurach);
- 2 – oceny struktury fibryny otrzymanej z preparatu handlowego fibrynogenu i z osocza krwi zwierzęcej w obecności związków rtęci (badania *in vitro* i *ex vivo*);
- 3 – wpływu rtęci na proces tworzenia i strukturę fibryny u ludzi bezpośrednio narażonych na pary rtęci;
- 4 – wpływu statyn na proces generowania fibryny w hipercholesterolemii i w chorobach nowotworowych,
- 5 – wpływu nowych zsyntetyzowanych związków będących pochodnymi kumaryny i chromonu: a/ na proces tworzenia fibryny bez i w obecności zasadowego czynnika wzrostu bFGF, b/ badanie efektu terapeutycznego pochodnych chromonu i kumaryny w procesie angiogenezy w zależności od stężenia na komórkach czarnej linii WM-115 (badania *in vitro*);
- 6 – opracowania nowych nośników (scaffolds) dla czynników wzrostu z zastosowaniem fibryny w połączeniu z chitozanem. Określono kinetykę uwalniania: a/ zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor, bFGF), b/ transformującego czynnika wzrostu beta-1 (transforming growth factor beta-1, TGFβ1), c/ płytkowego czynnika wzrostu (platelet derived growth factor, PDGF-BB) w obecności przeciwbólowego leku – ketoprofenu, d/ przeprowadzono badania fizykochemiczne membran fibrynowych i fibrynowo-chitozanowych oraz fibrynowo-kolagenowych.

BADANIA *IN VIVO*

Wykazano, że octan fenylortęciowy (1), chlorek rtęciowy (2, 3) i chlorek metylortęciowy (4) powodują u szczurów nadkrzepliwość wyrażającą się skróceniem czasu generowania trombiny i zwiększoną dynamiką formowania skrzepu potwierdzoną badaniami tromboelastograficznymi. Udowodniono, że za zmiany w strukturze fibryny odpowiedzialny jest głównie czynnik stabilizujący fibrynę (\times III, FSF). Zawartość rtęci w osoczu szczurów, którym podawano dożołądkowo badane związki mieściła się w granicach $1,7 \times 10^{-5}$ – $8,6 \times 10^{-7}$ mol/l (17,9 mg/kg). Związki fenylortęciowe ulegały stosunkowo szybkiej biotransformacji do rtęci jonowej, dlatego też istotne zmiany obserwowane w pierwszym dniu po podaniu można przypisać bezpośredniemu działaniu tego metalu. Zarówno chlorek rtęciowy, jak i octan fenylortęciowy powodowały znaczące skrócenie czasu krzepnięcia, czasu protrombinowego, wzrost stężenia fibrynogenu oraz czynnika \times w osoczu krwi. Zahamowana została aktywność antytrombinowa i fibrynolityczna osocza. Obniżenie aktywności fibrynolitycznej u zwierząt eksponowanych na chlorek rtęciowy było spowodowane najprawdopodobniej hamowaniem aktywności aktywatora plazminogenu (3). W badaniach nad efektem działania chlorku metylortęciowego stosowano dawkę pojedynczą (17,9 mg/Hg/kg) oraz wielokrotną (5×8 mg Hg/kg/dzień). Zaobserwowano znaczną nadkrzepliwość (czas krwawienia $204,0 \pm 117,6$ s w porównaniu z kontrolą $334,6 \pm 78,7$ s, retrakcja skrzepu $44,9 \pm 7,1\%$ w porównaniu z kontrolą $52,7 \pm 4,5$) oraz wzrost stężenia fibrynogenu w osoczu. W badaniach tromboelastograficznych na osoczu szczurów eksponowanych na związki rtęci uzyskane wyniki świadczą o ich wpływie na szybkość polimeryzacji i strukturę fibryny. Za zmiany w strukturze wytworzonej fibryny odpowiada najprawdopodobniej czynnik stabilizujący fibrynę (FSF), katalizujący wytwarzanie wiązań krzyżowych (ϵ , γ glutamyl-lizynowych). Oznaczona aktywność FSF w osoczu i w płytkach krwi szczurów za pomocą metody spektrofluorescencyjnej z użyciem monodansylkadaweryny wykazała, że po podaniu pojedynczej dawki octanu fenylortęciowego (17,9 mg Hg/kg) oraz wielokrotnej ($2 \times$ w tygodniu i 1,79 mg Hg/kg przez okres 152 dni) aktywność enzymu znacznie wzrasta, co świadczy o jego wpływie na usieciowanie wytworzonej fibryny (5).

BADANIA *IN VITRO* I *EX VIVO*

W celu wyjaśnienia mechanizmu działania związków rtęci prowadzącego w niskich stężeniach do nadkrzepliwości u zwierząt, prowadzono badania w warunkach *in vitro*. Na podstawie analizy *Scatcharda* określono stopień wiązania fibrynogenu, fibryny nieusieciowanej i jej monomerów z rtęcią stosując zakres stężeń 10^{-4} – 10^{-7} mol/dm³ (6). Wynosił on odpowiednio $8,8 \pm 1,2$; $3,4 \pm 1,0$; $4,5 \pm 0,7$ μ g/mg białka. Przy tych samych stężeniach przeprowadzono badanie polimeryzacji fibryny i monomerów fibryny. Wykazano, że rtęć w stężeniach 10^{-4} – 10^{-7} mol/dm³ powoduje przyspieszenie procesu polimeryzacji fibryny, w zależności od stężenia, nie wpływa natomiast na repolimeryzację monomerów fibryny.

Dalsze badania (7) w warunkach *ex vivo* miały na celu wyjaśnienie, czy chlorek i metylochlorek rtęciowy w stężeniach w jakich powodują nadkrzepliwość (10^{-7} – 10^{-5} mol/dm³) wpływają na ilość:

- trombiny generowanej podczas wykrzepiania osocza,
- ilość trombiny związanej z fibryną,
- ilość trombiny generowanej z frakcji PPSB (czynniki II, VII, IX, X),
- stężenie fibrynopeptydów (FPA i FPB),
- polimeryzację fibryny i monomerów fibryny,
- plazminową degradację fibrynogenu i fibryny.

Adsorpcja trombiny na wytworzonym polimerze fibryny podczas wykrzepiania osocza zabezpiecza ten enzym przed szybką inaktywacją przez osoczowe inhibitory enzymów proteolitycznych głównie antytrombiny III. Trombina związana ze skrzepem oznaczona bezpośrednio po jego uformowaniu jest wskaźnikiem stopnia wytwarzania tego enzymu w ogólnym procesie wykrzepiania. Obniżenie stopnia generacji trombiny w obecności związków rtęci sugeruje utrudnione uwalnianie trombiny ze skrzepu. Zastosowanie frakcji PPSB jako źródła czynników II, VII, IX, X pozwoliło na bezpośrednie oznaczenie ilości generowanej trombiny. Na podstawie badań można było wnioskować, że związki rtęci w stężeniach 10^{-7} – 10^{-5} mol/dm³ nie powodują zmian na etapie aktywowania protrombiny. Istotnym było natomiast badanie stopnia uwalniania fibrynopeptydów (FPA i FPB) z fibrynogenu pod wpływem trombiny i ich wpływ na strukturę skrzepu (8). Uzyskane obniżenie ilości uwalnianych fibrynopeptydów w obecności związków rtęci, nie znajduje odbicia w szybkości polimeryzacji fibryny. Fibrynogen wiąże jednak znaczne ilości jonów rtęci, możliwe zatem, że fibrynopeptydy odszczepione podczas trombinowej konwersji fibrynogenu w obecności związków rtęci pozostają związane z fibryną. Wynika to z możliwości ich wbudowania do sekwencji β 15-42 w fibrynie, odpowiedzialnej za wiązanie białek, heparyny oraz płytek krwi (9). Takie możliwości wiązania, wykazane przez innych autorów, istnieją również z integrynami $\alpha_v\beta_3$ poprzez sekwencję RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) ułożoną w łańcuchu α 572-575 oraz z kadherynami poprzez sekwencję β 15-42 (10).

Chlorek rtęciowy w stężeniach 10^{-7} – 10^{-5} mol/dm³ (0,1–10 μ mol) powoduje większe zmiany w procesie polimeryzacji fibryny niż metylochlorek rtęci, jednak w obu przypadkach stwierdzono wpływ badanych związków rtęci w tych stężeniach na strukturę fibryny.

Fibryna wytworzona w obecności chlorku i metylochorku rtęciowego wykazuje zmniejszoną podatność na działanie plazminy (11). Zwiększoną oporność na degradację proteolityczną fibryny wytworzonej z fibrynogenu preinkubowanego ze związkami rtęci obserwowano zarówno dla fibryny nieusieciowanej (non-crosslinked fibrin, NXL), nie zawierającej czynnika fibrynostabilizującego (FSF) ani jonów wapnia, częściowo usieciowanej (partly crosslinked fibrin, PXL), zawierającej tylko FSF (lub jony wapnia) oraz całkowicie usieciowanej (totally crosslinked fibrin, TXL) z jonami wapnia i czynnikiem FSF. Obydwa związki powodowały obniżenie ilości formowanych polimerów α i dimerów γ , w fibrynie NXL pozostających w zależności od aktywności czynnika stabilizującego fibrynę. O zmianie struktury fibryny i większym jej usieciowaniu świadczy również zwiększona ilość wbudowanej monodansylkadaweryny do żelu fibrynowego (5).

ZMIANY W TWORZENIU FIBRYNY U LUDZI NARAŻONYCH NA PARY RTĘCI

W kolejnych badaniach oznaczono wybrane parametry krzepnięcia świadczące o zmianach w strukturze fibryny. Badania przeprowadzono na ochotnikach pracujących w Łódzkiej Wytwórni Termometrów (12).

W osoczu krwi badanych ludzi oznaczano generację trombiny (TG), aktywność czynnika stabilizującego fibrynę (FSF), poziom kompleksu trombina-antytrombina III (TAT), stężenie rozpuszczalnych monomerów fibryny (FM) – parametrów zależnych od obecności aktywnej trombiny-, stężenie β -tromboglobuliny (β TG), płytkowego czynnika 4 (PF4), i białka C. Wykazane różnice wybranych parametrów krzepnięcia świadczyły o zmianach w strukturze fibryny i szybkości jej wytwarzania. Statystycznie wzrosła ilość generowanej trombiny ($6,7 \text{ HIH}/\text{cm}^3$, w porównaniu z kontrolą ($4,7 \text{ NIH}/\text{cm}^3$), aktywność czynnika fibrynostabilizującego ($20,6 \text{ U}/\text{cm}^3$, kontrola $16,3 \text{ U}/\text{cm}^3$) oraz stężenie płytkowego czynnika 4 ($26,5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, kontrola $20,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Wyniki te potwierdziły wcześniejsze badania na zwierzętach wskazujących na występowanie hyperkoagulacji po ekspozycji na rtęć.

BADANIA PARAMETRÓW KRZEPNIĘCIA U LUDZI Z ZABURZENIAMI NACZYNIOWYMI OBCIĄŻONYCH CHOROBYMI NOWOTWOROWYMI

Procesy zakrzepowo-zatorowe są uważane za ważny etiopatologiczny mechanizm chorób sercowo-naczyniowych, dlatego nieprawidłowości w procesie tworzenia fibryny są przedmiotem zainteresowania różnych dziedzin medycyny. Dotychczas wskazywano, że zmiany w strukturze fibryny zależne są od aktywności czynnika XIII, która może być zróżnicowana wystąpieniem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNPs) w genach kodujących w/w białka. Skutkuje to zmianą pojedynczego aminokwasu w jego sekwencji pierwszorzędowej – dla czynnika XIII (Val34Leu) oraz fibrynogenu (A α Thr312Ala i B β 455G/A). Powyższe zmiany mogą mieć istotny wpływ na funkcje wielu procesów i mogą być przyczyną chorób układu krążenia (13).

W kolejnych badaniach oznaczono stopień generowania trombiny bezpośrednio odpowiedzialnej za powstawanie fibryny i za nadkrzepliwość, którą stwierdzono w zaburzeniach gospodarki lipidowej (14, 15) oraz zmian wywołanych czynnikami środowiskowymi (16).

Wprowadzona metoda badania rejestracji przebiegu procesu generowania trombiny okazała się być przydatna w ocenie leczenia hypercholesterolemii za pomocą statyn simwa- i atorwastatyny. Statyny należą do leków, które obniżają poziom czynników zapalnych (białko C-reaktywne, IL-6 i TNF- α), zmniejszają ekspresję czynnika tkankowego (TF) i obniżają proces generowania trombiny.

Wytworzona fibryna w procesie konwersji fibrynogenu z jednej strony umożliwia wzrost nowych naczyń krwionośnych, z drugiej zaś fibrynogen, jak i fibryna, ułatwiają aktywację i utrzymują stabilność bFGF oraz innych czynników wzrostu biorących udział w procesie angiogenezy (17). W badaniach nad rozwojem

guzów narządów rodnych stwierdzono, że w procesie nowotworzenia aktywacja zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) związana jest ze zwiększonym stężeniem fibrynogenu i zmianami właściwości fizykochemicznymi fibryny (18). U kobiet chorych wykazano znaczący wzrost poziomu zasadowego czynnika wzrostu ($51,40 \pm 13,72 \text{ pg/cm}^3$, podwyższone stężenie fibrynogenu ($348,26 \pm 64,74 \text{ mg/cm}^3$) oraz zwiększenie lepkości fibryny ($2,63 \pm 0,36 \text{ mPa}$; dla kontroli $1,96 \pm 0,63 \text{ mPa}$) w porównaniu z grupą kobiet zdrowych. Wykazano silne antyangiogenne działanie cephazolinu oraz clindamycyny w połączeniu z metronidazolem w leczeniu guzów.

BADANIE ANTYANGIOGENNEGO DZIAŁANIA POCHODNYCH CHROMONU I KUMARYNY NA HODOWLACH KOMÓRKOWYCH (WM-115)

Fibryna stymuluje syntezę i sekrecję czynnika tkankowego (TF), prostacyklin, interleukiny 8 (IL-8), prostacyklin (PGI), hamuje uwalnianie inhibitora-1 aktywatora plazminogenu (PAI-1), nasila aktywację czynnika von *Willebranda* (18). Istotnym miejscem w cząsteczce fibryny jest sekwencja $\beta 15-42$ (19), odpowiedzialna za interakcję z białkami oraz czynnikami wzrostu (bFGF, VEGF, IGF-1, -3) co wzmacnia jej proangiogenne działanie (20, 21). Fibryna pośredniczy w adhezji i rozprzestrzenianiu się komórek śródbłonna poprzez integrynowe białka $\alpha_v\beta_3$ do miejsca o sekwencji RGD w pozycji 252-254 oraz 572-574 łańcucha α . Za wiązanie z bFGF odpowiedzialna może być też odsłonięta w procesie plazminowej degradacji fibrynogenu i fibryny sekwencja RGDS (Arg-Gly Asp-Ser) (22).

Czynniki wzrostu związane poprzez specyficzne receptory znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonna indukują proliferację komórek guza, promują angiogenezę i progresję nowotworu. Związane z fibryną chronione są przed proteolityczną degradacją metaloproteinaz (MMPs).

Właściwości wiązania bFGF przez fibrynę wykorzystano jako model do badania antyangiogenne działanie związków pochodnych chromonu i kumaryny, przetestowanych wcześniej w kierunku ich aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej (23, 24, 25). Niektóre z nich wykazywały w badaniach *in vivo* i *in vitro* efekt cytotoksyczny w stosunku do białaczek odpowiednio L1210, P388, HL-60, NALM-6.

Z badań naszych wynika, że pochodne fosfohydrazonowe kumaryny i chromonu wykazują wpływ na angiogenezę, obniżając lepkość i stopień polimeryzacji fibryny (26). Spośród pochodnych kumaryny, związek który zawiera podstawnik metylowy przy atomie azotu w układzie fosforohydrazynowym i jest estrem metylowym tiofosforowego kwasu, obniża zarówno polimeryzację jak i lepkość fibryny. Wśród chromonów takie działanie wykazuje pochodna, zawierająca *N*-metylofosforohydrazonowy podstawnik. Niektóre z nich zmniejszają również stopień wiązania bFGF do fibryny (dane nieopublikowane). Antyangiogenne działanie pochodnych chromonu i kumaryny potwierdzono na komórkach czerniaka WM-115 w stężeniach 10^{-4} – 10^{-9} mol/dm^3 , przeprowadzając oznaczenie stężenia zasadowego czynnika wzrostu bFGF oraz jego receptora FGFR1 (27).

WYTWORZENIE MEMBRAN FIBRYNOWYCH I FIBRYNOWO-CHITOZANOWYCH (SCAFFOLDS), KINETYKA UWALNIANIA TGF BETA1, bFGF ORAZ PDGF

Z uwagi na fakt, że fibryna ma zdolność wiązania się z czynnikami wzrostu (bFGF, TGF-beta1) istnieje potencjalna możliwość wykorzystywania tego polimeru w inżynierii tkankowej, jako czynnika proangiogenego (scaffold) stosowanego w chirurgii kardiologicznej, regeneracji tkanki nerwowej, kostnej, wątroby i ścięgien. Zastosowanie w membranach mieszanin polimerów – fibryny i chitozanu pozwoliło na uzyskanie nowych nośników chitozanowo-fibrynowych o zróżnicowanej szybkości uwalniania czynników wzrostu PDGF-AB, TGF-beta1 i bFGF (28, 29). Zbadano również kinetykę uwalniania PDGF-AB w obecności powszechnie stosowanego ketoprofenu. Selektywny dobór membrany, badanie właściwości fizykochemicznych, kinetyka uwalniania czynników wzrostu (TGF β 1) pozostają przedmiotem naszych badań (30).

M. Michalska

INTERACTION OF FIBRIN WITH MERCURIC COMPOUNDS, ANGIOGENIC FACTORS AND NEW PHOSPHOHYDRAZONE DERIVATIVES OF CHROMONE AND COUMARIN PART. II. RESEARCH PROJECT

PIŚMIENNICTWO

1. *Michalska M., Plewiński J., Wierzbicki R.*: Badania tromboelastograficzne osocza szczurów narażonych na octan fenylortęciowy. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1980; 12(1): 55-58. – 2. *Michalska M., Krajewska U., Wierzbicki R.*: Krzepnięcie i aktywność fibrynolityczna krwi szczurów w ostrym zatruciu związkami rtęci. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1983; 26(3-4): 253-258. – 3. *Michalska M., Mirowski M., Wierzbicki R.*: Coagulation and fibrinolysis in rats poisoned with mercuric chloride. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1988; 40: 365-371. – 4. *Kostka B., Michalska M., Krajewska U., Wierzbicki R.*: Blood coagulation changes in rats poisoned with methylmercuric chloride (MeHg). *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1989; 41: 183-189. – 5. *Michalska M., Wierzbicki R.*: Plasma and platelet fibrin-stabilizing factor activity in rats intoxicated with phenylmercuric acetate. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1984; 36: 611-615. – 6. *Wierzbicki R., Michalska M., Cierniewski C.S.*: Interaction of fibrinogen with mercury. *Thromb. Res.*, 1983; 30: 579-585. – 7. *Michalska M.*: Wpływ związków rtęci na trombinową konwersję fibrynogenu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1988; 21(4): 293-298. – 8. *Michalska M., Wierzbicki R.*: Mercury(II) increases fibrin turbidity in the presence of fibrinopeptides. *J. Trace Elem. Exper. Med.*, 1990; 3: 23-30. – 9. *Mosseson M.W.*: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Thromb Haemost.*, 2005; 3: 1894-1904. – 10. *Sahni A., Francis Ch.W.*: Plasmic degradation modulates activity of fibrinogen-bound fibroblast growth factor-2. *J. Thromb. Haemost.*, 2003; 1: 1271-77.
11. *Michalska M., Andrykowski G.*: Wrażliwość fibryny ludzkiej uformowanej w obecności chlorku i metylochorku rtęciowego na degradację plazminową. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1993; 21: 297-302. – 12. *Wierzbicki R., Prażanowski M., Michalska M., Krajewska U., Mielicki W.*: Disorders in blood coagulation in humans occupationally exposed to mercuric vapors. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 2002; 15: 21-29. – 13. *Mills J.D., Ariens R.A.S., Mansfield M.W., Grant P.J.*: Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*, 2002; 106: 1938-42. – 14. *Michalska M., Kostka B.*: Statyny a generacja trombiny w hipercholesterolemii. *Probl. Ter. Monit.*, 2003; 14(3): 145-150. – 15. *Michalska M., Chojnowska-Jezińska J., Broncel M., Marezyk I., Sikora J., Kostka B.*: Ocena stopnia generacji trombiny i wiązania trombiny ze skrzepem w osoczu ludzi z hipercholesterolemią typu II leczonych statynami. *Przegl. Lek.*, 2005; 62 (suppl. 3): 1-4. – 16. *Ciejka E., Gorąca A., Michalska M.*

Kostka B.: Wpływ pola magnetycznego o niskiej częstotliwości na wybrane parametry układu krzepnięcia. *Pol. Merk. Lek.*, 2005; 19(110): 148-151. – 17. *Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Rak J.*: Contribution of the hemostatic system to angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004; 30(1): 5-20. – 18. *Collen A., Koolwijk P., Kroon M., Hinsberg V.W.M.*: Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 1998; 2: 152-156. – 19. *Mossesson M.W.*: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Thromb Haemost.*, 2005; 3: 1894-1904. – 20. *Sahni A., Sporn L., Francis C.*: Potentiation of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 14936-41.

21. *Sahni A., Francis Ch.W.*: Plasmic degradation modulates activity of fibrinogen-bound fibroblast growth factor-2. *J. Thromb. Haemost.*, 2003; 1: 1271-77. – 22. *Nawrot-Modranka J., Nawrot E.*: Synthesis, spectroscopy and alkylating properties of Pd(II) complexes of phosphorohydrazones of coumarin with potential antibacterial activity. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, 2007; 63: 429-434. – 23. *Nawrot-Modranka J., Ochocki J., Graczyk J.*: Phosphorohydrazines of 4-oxo-4H-1-benzopyran and 1-benzopyran-2, 4-dione exhibit antitumour activity against L1210 leukemia. *Pharmazie*, 2004; 59: 731-732. – 24. *Nawrot-Modranka J., Nawrot E., Graczyk J.*: *In vivo* antitumour, *in vitro* antibacterial activity alkylation properties of phosphorohydrazone derivatives of coumarin and chromone. *Eur. J. Med. Chem.*, 2006; 41: 1301-1309. – 25. *Michalska M., Pająk W., Kołodziejka J., Łazarenkow A., Nawrot-Modranka J.*: Influence of phosphorohydrazone derivatives of benzopyrones on polymerization and viscosity of fibrin. *Acta Bioch. Pol.*, 2008; 55(3): 613-617. – 26. *Michalska M., Łazarenkow A., Kaplińska K., Mirowski M., Nawrot-Modranka J.*: Influence of phosphorohydrazone derivatives of benzopyrones in presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) on fibrin polymerization. *Acta Biochim. Pol.*, 2011; (w druku). – 27. *Michalska M., Kozakiewicz M., Bodek K.H.*: Polimerowe nośniki czynników angiogennych. Cz. I. Membrana chitozanolowo-alginianowa jako nośnik PDGF-AB i TGF- β . *Polimery w Med.*, 2008; 38(4): 19-28. – 28. *Michalska M., Mirowski M., Bodek A., Bodek K.H.*: Release kinetics of basic fibroblast growth factor (bFGF) from certain biopolymers in the presence of ketoprofen. *Pharmazie*, 2010; 65: 818-823. – 29. *Michalska M., Kaplińska K., Mirowski M., Bodek A., Bodek K.H.*: Evaluation of using fibrin and microcrystalline chitosan membranes as carriers for transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1). *J. Appl. Polymer Sci.*, (w druku).

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1.