

# 中性粒细胞胞外诱捕网介导的急性缺血性卒中替奈普酶抵抗机制与昼夜节律干预策略的研究进展

杨尚松<sup>1</sup>, 黄小凤<sup>1</sup>, 李登星<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>右江民族医学院研究生学院, 广西 百色

<sup>2</sup>右江民族医学院附属西南医院(百色市人民医院)神经内科, 广西 百色

收稿日期: 2026年2月5日; 录用日期: 2026年2月27日; 发布日期: 2026年3月10日

## 摘要

急性缺血性卒中(Acute Ischemic Stroke, AIS)的药物再灌注治疗正处于从传统的阿替普酶(rt-PA)向替奈普酶(Tenecteplase, TNK)转变的关键时期。尽管TNK凭借其经过分子工程改良的纤维蛋白特异性和药代动力学特性, 展现出优于前一代药物的潜能, 但在临床实践中仍然有部分患者表现出显著的“溶栓抵抗”。近年来的研究发现, 血栓内部不仅包含纤维蛋白网, 还富含一种被称为“免疫血栓”骨架的中性粒细胞胞外诱捕网(Neutrophil Extracellular Traps, NETs)。这种由DNA与蛋白酶交织而成的网状结构, 在物理层面阻碍了溶栓药物的渗透, 并通过生化机制降低了TNK的药效。最新的时间生物学研究显示, 中性粒细胞活化及NETs分泌受Bmal1/CXCR4等多种生物钟基因调控, 周期具有明显昼夜波动趋势, 说明卒中的严重程度和治疗效果可能具有时间依赖性。本文旨在系统梳理NETs导致TNK溶栓抵抗的生物学机制, 阐述免疫系统的昼夜节律对血栓病理的影响, 并探讨利用DNase-1进行辅助溶栓及基于时间维度的精准治疗策略, 为提升AIS的临床再通率提供理论参考。

## 关键词

急性缺血性卒中, 替奈普酶, 中性粒细胞胞外诱捕网, 溶栓抵抗, 昼夜节律

## Mechanisms of NETs-Mediated Tenecteplase Resistance in Acute Ischemic Stroke and Advances in Chronotherapeutic Strategies

Shangsong Yang<sup>1</sup>, Xiaofeng Huang<sup>1</sup>, Dengxing Li<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise Guangxi

\*通讯作者。

文章引用: 杨尚松, 黄小凤, 李登星. 中性粒细胞胞外诱捕网介导的急性缺血性卒中替奈普酶抵抗机制与昼夜节律干预策略的研究进展[J]. 临床医学进展, 2026, 16(3): 1598-1606. DOI: 10.12677/acm.2026.163943

<sup>2</sup>Department of Neurology, Baise People's Hospital, Baise Guangxi

Received: February 5, 2026; accepted: February 27, 2026; published: March 10, 2026

## Abstract

Pharmacological reperfusion therapy for Acute Ischemic Stroke (AIS) is currently undergoing a pivotal transition from the traditional alteplase (rt-PA) to tenecteplase (TNK). Although TNK exhibits superior potential compared to its predecessor—owing to its bioengineered fibrin specificity and optimized pharmacokinetics—a significant subset of patients still manifests “thrombolysis resistance” in clinical practice. Recent investigations have revealed that thrombi are composed not only of a fibrin mesh but are also enriched with Neutrophil Extracellular Traps (NETs), which serve as the scaffold of “immunothrombosis.” This meshwork, interwoven with DNA and proteases, physically impedes the penetration of thrombolytic agents and biochemically attenuates the efficacy of TNK. Emerging chronobiological research indicates that neutrophil activation and NETs secretion are governed by various circadian clock genes, such as *Bmal1* and *CXCR4*, exhibiting distinct diurnal oscillations. This suggests that the severity of stroke and therapeutic responsiveness may be time-dependent. This review aims to systematically elucidate the biological mechanisms by which NETs induce TNK resistance, describe the impact of immune circadian rhythms on thrombus pathology, and explore adjuvant thrombolytic approaches using DNase-1 as well as chronotherapy-based precision medicine strategies. Ultimately, this work seeks to provide a theoretical reference for enhancing clinical recanalization rates in AIS.

## Keywords

Acute Ischemic Stroke, Tenecteplase, Neutrophil Extracellular Traps, Thrombolytic Resistance, Circadian Rhythm

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

急性缺血性卒中(AIS)作为全球范围内致死致残的首要病因之一，救治重点一直是“时间”和“再通”，治疗的根本目的是让缺血半暗带得到挽救，从而在脑组织发生完全性梗死前恢复其血流灌注。在过去的几十年里，药物溶栓一直是 AIS 治疗的基石[1]。尽管近年来血管内治疗技术飞速发展，但静脉溶栓凭借其便捷性、普适性和对非大血管闭塞患者的有效性，依然是临床一线的首选方案。但随着药物应用的普及，临床医生发现单纯依赖传统的溶栓药物往往难以应对复杂构成的血栓，特别是伴有高炎症负荷的病人，这促使学界开始寻找影响溶栓效率的深层机制。

### 1.1. 溶栓药物的进化史

自 1996 年重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA, 阿替普酶)获批以来，它长期占据着 AIS 药物治疗的统治地位。但 rt-PA 并非完美，其半衰期短、需要持续静脉滴注且对纤维蛋白特异性有限等缺点一直是临床应用的痛点。为了克服这些局限，蛋白质工程技术催生了替奈普酶(TNK)——一种由 t-PA 分子经过三处关键的氨基酸定点修饰而来的第三代溶栓剂。这些微观结构的改变带来了宏观药理特性的巨大变化。

T103N 的引入和 N117Q 的移除改变了分子的糖基化模式,这两处氨基酸的改变让肝脏对药物的清除率大大降低,将 TNK 的血浆半衰期显著延长至 20~24 分钟[2],是 rt-PA 的 4 倍以上,使得 TNK 可以实现“单次静脉团注”,即在 5~10 秒内完成给药,很大程度上简化了给药流程,缩短了从入院到治疗(DNT)的时间[3]。KHRR296-299AAAA 的四丙氨酸替换,使得 TNK 对血浆中 PAI-1 (纤溶酶原激活物抑制剂-1)的耐受性提高了 80 倍,同时其对血栓部位纤维蛋白的亲合力(特异性)比 rt-PA 高出 14 倍[4]。因此 TNK 能更精准地“追踪”血栓,减少对全身凝血系统的干扰,从理论上降低了全身出血的风险。

近年来由多项大规模 RCT 如加拿大的 AcT 试验[5]、中国的 TRACE-2 试验[6]以及英国的 ATTEST-2 试验[7]等的结果显示,与 rt-PA 相比,TNK 用于 AIS 的溶栓治疗并不劣于 rt-PA,并且在一些指标上优于 rt-PA [8]。这些高等级循证医学证据正推动着全球卒中治疗指南的更新[9] [10],TNK 有望成为新时代的标准溶栓药物。

## 1.2. 溶栓治疗中的溶栓抵抗

虽然 TNK 在药理学上表现优异,但在真实世界的临床应用中仍面临着一个不容忽视的困境,仍有约 80%的大血管闭塞的患者在接受足量 TNK 治疗后没能在早期实现血管再通[11]。

长期以来传统的血栓学理论倾向于将血栓视为红细胞与血小板被纤维蛋白网罗的简单聚合物,因此溶栓治疗的靶点较为单一地聚焦于降解纤维蛋白,这种“一维”的治疗策略低估了血栓的生物学复杂性。最新的病理研究结果提示,缺血性卒中本质上是一种“免疫-血栓”炎症反应,在这种病理环境下,血栓内部积聚了大量的先天免疫细胞,特别是中性粒细胞。这些免疫细胞并不是旁观者,而是积极的参与者。Mengozi L 等人[12]的研究形象地将中性粒细胞及其释放的衍生物称为血栓中的“暗物质”,中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)是其中的核心主角。这些“暗物质”成分在常规病理染色中常被人忽视,但实际上它们参与构成血栓极其坚固的内部支架,从而导致了以纤维蛋白为靶点的 TNK 药物的天然抵抗。这种原本用于捕获病原体的防御机制[13],在缺血性脑损伤的无菌性炎症环境下发生了病理性的异化[14],成为了阻碍药物溶栓的坚固壁垒。

但 NETs 并非是 TNK 的溶栓抵抗的唯一机制,血小板、血管性血友病因子(vWF)等亦是抗纤溶的主要成分[15],且血栓的成分不同,对于 TNK 的反应程度也存在明显差异[16]。对于 TNK 抵抗血栓,机械取栓(MT)仍是血管再通的最重要手段[17],即使 TNK 不能完全溶解血栓,它也可能溶解血栓周边的疏松区域,从而松解血栓与血管壁的粘连,降低 MT 的难度和次数。

本文通过综述 NETs 导致 TNK 溶栓抵抗的生物学机制、免疫系统的昼夜节律对血栓病理的影响,探讨利用 DNase-1 进行辅助溶栓及基于时间维度的精准治疗策略,旨在为提升 AIS 的临床再通率提供理论参考。

## 2. 免疫血栓与 NETs

为了理解溶栓抵抗,必须深入微观世界,剖析免疫系统如何介入血栓的构建。

### 2.1. NETs 的形成

中性粒细胞是人体应对急性损伤的“急先锋”,在缺血发生后的数小时内即可大量浸润脑组织。在缺血缺氧、炎症因子及活化血小板的共同刺激下,中性粒细胞会启动一种独特的程序性死亡方式——NETosis,向胞外释放 NETs [18]。这一过程不同于凋亡或坏死,是一种主动的防御机制。其生化路径主要依赖于钙离子内流[19]触发的肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4)的激活。PAD4 入核后会与组蛋白 H3 (特别是精氨酸位点)进行瓜氨酸化修饰,这种修饰移除了组蛋白的正电荷,破坏了其与带负电 DNA 之间的

静电吸附力, 导致原本高度折叠致密的染色质瞬间解螺旋并变得松散膨胀[20], 这也将导致核膜破裂, 松散的 DNA 骨架在胞质中吸附大量具有细胞毒性的颗粒蛋白(如中性粒细胞弹性蛋白酶 NE、髓过氧化物酶 MPO), 最终突破细胞膜喷射而出。这些释放到胞外的 DNA 网状结构原本是为了捕获细菌[13], 但在血管内它们却成为了粘附血小板、红细胞的“强力胶水”, 极大地促进了血栓的生长与稳定。

## 2.2. 血栓的微观病理学发现

随着高分辨率显微成像技术的应用, 有研究发现血栓并不是均质的“果冻”[21], 而是具有高度空间异质性的实体, 且不同病因的血栓成分迥异。心源性血栓、静脉血栓通常富含 NETs、血小板和 vWF 因子, 红细胞相对较少, 即“白栓”; 而动脉粥样硬化性血栓则多为富含红细胞的“红栓”[21]。针对血栓的形态学分析发现, 红栓对 TNK 高度敏感, 其疏松的网状结构允许药物迅速渗透, 且富含纤维蛋白底物, 易于溶解[16][17]。而白栓常呈现出一种特殊的“核-壳”结构。血栓中央即“核”主要是红细胞组成, 血栓的外表面即“壳”主要由压缩的血小板、vWF 因子和高密度的 NETs 纤维交织而成, 血栓的“外壳”将药物隔绝在外。实验数据显示, 这类血栓在经过 TNK 处理后, 虽然部分纤维蛋白被溶解, 但仍残留有白色的、富含 DNA 的 NETs[22]。这表明在 TNK 治疗下的 NETs 比纤维蛋白更难被降解, 它是导致血管残留闭塞的关键残留物。

## 3. NETs 介导替奈普酶抵抗的三重机制

NETs 导致 TNK 溶栓失败并非巧合, 而是基于其独特的生物物理与生物化学特性。其致病机理可以归纳为物理、化学与底物修饰三个维度。

### 3.1. 物理屏障与空间位阻效应

TNK 作为一种大分子糖蛋白, 分子量约为 65 kDa, 要达到溶栓效果, 需要与血栓中纤维蛋白接触。而 NETs 形成的 DNA 纤维网孔径极小, 且这种 DNA 纤维网密度远远大于常规的纤维蛋白网[22]。这种致密的网状结构在血栓表面构成了一道物理屏障, 产生了“空间位阻效应”。对于 TNK 分子来说, 这层屏障就像致密的筛网一样, 将它拦截在血栓的最外层, 没办法向血栓深处渗透。这种渗透限制导致药物只能在血栓表面非常有限的区域发挥作用, 而无法崩解血栓的核心。这也是为什么临床上增加 TNK 剂量却无法提高疗效, 并且还会增加出血风险的原因——药物根本无法到达靶点。

### 3.2. 酶的劫持与非特异性吸附

除了被动的物理阻隔, NETs 还通过化学手段主动消耗药物。NETs 骨架由 DNA 构成, DNA 是强负电荷聚合物。这种电荷特性使其成为一个巨大的离子交换树脂, 能够非特异性地吸附带有正电荷区域的蛋白质。研究证实, t-PA 及其衍生物 TNK 容易被 DNA 网格非特异性地吸附[15]。这种现象被称为“酶的劫持”或“滴定效应”。大量的 TNK 分子被困在 DNA 网上, 无法结合到其真正的底物纤维蛋白上。而且 NETs 上镶嵌的组蛋白本身也是纤溶酶的竞争性抑制剂, 它们能结合并中和刚刚生成的纤溶酶, 使其在降解纤维蛋白之前就失去活性[23]。这种化学层面的“诱导与灭活”, 极大地降低了局部有效药物浓度[24]。

### 3.3. 底物修饰与结构刚性化

第三重机制在于 NETs 改变了血栓本身的材质。在凝血因子 XIIIa 的催化下, NETs 中的组蛋白可以与纤维蛋白发生共价交联, 形成“组蛋白-纤维蛋白”杂交复合体[23]。这种杂交纤维比单纯的纤维蛋白更粗、更硬, 且具有极强的抗酶解能力。组蛋白的掺入似乎掩盖了纤维蛋白上的赖氨酸结合位点, 使得

TNK 难以识别底物。此外, NETs 增加了血栓的机械硬度, 使其更难被血流剪切力冲刷破碎[24]。体外实验表明, 富含 NETs 的血栓, 溶解其所需的时间是普通血栓的数倍[15], 且往往只能实现部分溶解。

## 4. 溶栓治疗的昼夜节律

既往的卒中治疗方案大多忽略了发病时间点对病理生理的影响。近年来的多项研究引入了“时间生物学”视角, 揭示了免疫系统的昼夜节律特征。

### 4.1. 中性粒细胞的生物钟震荡

中性粒细胞并不是整日维持恒定的功能状态的, 活性由生物钟基因(如 *Bmal1*、*CXCR4*)精密调控[25][26], 呈现出 24 小时的周期性震荡。Vázquez-Reyes 等人[27]的研究发现, 在机体“非活跃期”(相当于人类的夜间至次日清晨), 循环中的中性粒细胞处于一种“预激化”状态, 细胞内的生物钟基因表达谱发生偏移, 细胞表型呈现出“促 NETs 化”的特点, 即此时“非活跃期”的中性粒细胞对缺血性的刺激更为敏感, 并且更容易发生脱颗粒反应而导致释放大量 NETs。在“活跃期”(相当于人类的白天), 中性粒细胞则表现得比较“温和”, NETs 释放能力也相对较弱。

### 4.2. 卒中结局的昼夜差异

这种免疫节律直接映射到了卒中的临床结局上。流行病学数据长期以来一直提示, 清晨或夜间发病的卒中患者预后往往较差[28][29], 且对溶栓的反应不佳。现在的分子生物学证据为此提供了合理解释。既往研究表明, 缺血性脑卒中会引起强烈的炎症反应, 导致低灌注区的中性粒细胞浸润[30], 而中性粒细胞的浸润又会加重神经元的损伤[31]。实验表明, 在非活跃期(高 NETs 时段)诱导的卒中, 其最终梗死体积显著大于活跃期诱导的卒中[27], 充分说明了中性粒细胞的生物钟对于卒中的结局有着重要影响。

### 4.3. 治疗的时间窗效应

既然病理机制随时间波动, 那么对应的治疗策略也应作出调整。研究人员发现, 针对 NETs 的干预同样具备“时间依赖性疗效”。在动物模型[32]中, 当非活跃期给予抗 NETs 药物(如 DNase-1), 因为此时体内的 NETs 负荷很高, 药物起效明显, 可以明显减少梗死体积和改善神经功能。但是当在活跃期(低 NETs 基线)给予同等剂量的药物, 药效则变得微乎其微。该发现有重要的临床转化意义, 提示未来的溶栓治疗可能需要根据患者的发病时刻来决定是否联用抗 NETs 药物, 从而实现基于时间维度的精准医疗。

## 5. 基于 NETs 靶点的辅助溶栓治疗

鉴于 NETs 是 TNK 抵抗的重要物理与生化屏障, 且具有明确的时间节律, 未来的药物研发应更加注重如何打破这一屏障, 辅助 TNK 发挥效能。

### 5.1. DNase-1 与 NETs 靶向干预

脱氧核糖核酸酶-I (DNase-1)是目前研究最深入的 NETs 靶向药物。它是一种已经在临床上用于治疗囊性纤维化的成熟药物(Dornase Alfa), 并且已有研究证实了其安全性[33]。在辅助溶栓的场景下, DNase-1 的作用机制是特异性水解 NETs 的 DNA 骨架。一旦 DNA 骨架被切断, 附着其上的组蛋白和酶类也将随之散落, 原本致密的血栓外壳瞬间瓦解。这不仅消除了阻挡 TNK 渗透的物理屏障, 还释放了被 DNA 吸附的溶栓药物, 逆转了“滴定效应”。Xu 等人[22]的体外模型研究表明, TNK 与 DNase-1 联用能产生强大的协同效应, 它们可以将血栓溶解率提高数倍, 且未显著增加出血风险。

目前, 旨在评估 DNase-1 辅助 TNK 溶栓疗效的 II 期临床试验(如 EXTEND-1A DNase)正在进行中,

其采用了贝叶斯自适应设计, 试图寻找最佳的药物配比。如果能证实它的安全与有效性, 这将是首个针对血栓“免疫成分”的联合溶栓疗法。

## 5.2. PAD4 抑制剂与 NETs 源头阻断

不同于事后降解(DNase-1), 从源头阻断 NETs 形成也是备受关注的策略。PAD4 是 NETs 形成的关键限速酶[34], 小分子 PAD4 抑制剂(如 GSK484 及其衍生物)能够阻止组蛋白的瓜氨酸化, 从根本上抑制染色质的解螺旋和 NETs 的释放[35]。相较于 DNase-1, PAD4 抑制剂的优势在于其可能具有更广泛的血管保护作用, 不仅能减少大血管内的血栓负荷, 还能防止微循环中的中性粒细胞粘附和微血栓形成[36]。但此类药物目前的研发多处于临床前阶段, 其作为急性期用药的起效速度及对免疫系统的长期影响仍需进一步评估。

## 5.3. 秋水仙碱与微管依赖性 NETs 抑制

秋水仙碱作为一种应用较早的抗炎药, 近年来在心血管领域表现突出。它通过抑制微管聚合, 不仅能阻断中性粒细胞的趋化游走, 还能干扰 NETosis 所需的细胞骨架重排, 从而减少 NETs 的生成[37]。在脑血管领域, CONVINCENCE [38]和 CHANCE-3 [39]试验评估了秋水仙碱在二级预防中的作用, 虽然未得到积极的结论, 但是其抗 NETs 特性可能有助于在急性期减轻再灌注损伤, 目前仍需专门的急性期的试验来证实。

## 6. 精准医疗路径展望

基于上述血栓成分的异质性和昼夜节律的变化的阐述, 未来的 AIS 溶栓药物治疗流程可能会发生改变, 治疗的模式需要向精准医疗方向进行转变。

AIS 的治疗长期以来遵循“时间就是大脑”的原则, 其中进门至溶栓时间(DNT)是衡量卒中中心救治效率的核心指标。现有的流行病学与病理生理学证据表明, DNT 的每一分钟延迟都伴随着不可逆的神经元丢失与临床预后的显著恶化[40]。近年来, 全球卒中指南逐渐将 DNT 的目标从 60 分钟压缩至 45 分钟甚至 30 分钟。30 分钟内接受溶栓的患者, 其 3 个月 mRS 评分 0~2 分的几率是 60 分钟以上组的 2.35 倍 (OR 值 2.35, 95% CI 1.26~4.39) [41]。理想的精准治疗流程不应以延长 DNT 作为代价。目前急诊卒中绿色通道(Code Stroke)的常规流程为接诊 - 抽血 - CT - 等待结果 - 溶栓, 未来理想的精准治疗流程则需要利用 CT 检查不可压缩的物理时间(通常 15~25 分钟), 通过床旁快速检测(POCT)技术检测血液中特异性的 NETs 生物标志物(如瓜氨酸化组蛋白 H3Cit 或 MPO-DNA 复合物), 在等待 CT 结果与溶栓前的时间快速评估患者的“免疫血栓负荷”及可能的预后情况[42]。对于在夜间发病或生物标志物水平极高的患者, 采用“TNK + DNase-1”或“TNK + 抗炎药物”的联合方案; 而对于低负荷患者, 单纯 TNK 治疗可能已足够。这种分层治疗策略将最大化疗效并最小化药物暴露风险。

必须强调的是, 时间对于挽救缺血脑组织极其重要。如果 POCT 检测耗时超过了 CT 检查的时间窗而导致 DNT 被迫延长, 那么检测带来的精准获益很有可能会被时间延误造成的神经元损伤(每分钟 190 万个)所抵消[40][43]。因此只有当 NETs 生物标志物检测能实现“零延误”嵌入现有急救流程时, 其临床应用才具备真正的卫生经济学价值, 否则在现有技术条件下, 经验性快速溶栓仍是首选策略。

## 7. 总结

综上, NETs 作为血栓内部的“暗物质”, 通过构建物理屏障、化学劫持及底物修饰等复杂机制, 构成了 TNK 疗效的天花板; 且这一病理过程受到昼夜节律的深刻影响, 呈现出非活跃期高发的特征。打破这一僵局的关键在于将治疗的视野从单纯的“溶栓”扩展到“免疫溶栓”, 通过引入 DNase-1 等靶向 NETs

的药物,并结合时间生物学规律进行择时治疗,我们有望攻克 TNK 抵抗这一临床难题,进一步改善缺血性卒中患者的预后。

## 参考文献

- [1] Powers, W.J., Rabinstein, A.A., Ackerson, T., Adeoye, O.M., Bambakidis, N.C., Becker, K., *et al.* (2019) Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, **50**, e344-e418. <https://doi.org/10.1161/str.0000000000000211>
- [2] Tanswell, P., Modi, N., Combs, D. and Danays, T. (2002) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tenecteplase in Fibrinolytic Therapy of Acute Myocardial Infarction. *Clinical Pharmacokinetics*, **41**, 1229-1245. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241150-00001>
- [3] Warach, S.J., Dula, A.N. and Milling, T.J. (2020) Tenecteplase Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, **51**, 3440-3451. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.120.029749>
- [4] Keyt, B.A., Paoni, N.F., Refino, C.J., Berleau, L., Nguyen, H., Chow, A., *et al.* (1994) A Faster-Acting and More Potent Form of Tissue Plasminogen Activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 3670-3674. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3670>
- [5] Menon, B.K., Buck, B.H., Singh, N., Deschaintre, Y., Almekhlafi, M.A., Coutts, S.B., *et al.* (2022) Intravenous Tenecteplase Compared with Alteplase for Acute Ischaemic Stroke in Canada (AcT): A Pragmatic, Multicentre, Open-Label, Registry-Linked, Randomised, Controlled, Non-Inferiority Trial. *The Lancet*, **400**, 161-169. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)01054-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)01054-6)
- [6] Wang, Y., Li, S., Pan, Y., Li, H., Parsons, M.W., Campbell, B.C.V., *et al.* (2023) Tenecteplase versus Alteplase in Acute Ischaemic Cerebrovascular Events (TRACE-2): A Phase 3, Multicentre, Open-Label, Randomised Controlled, Non-Inferiority Trial. *The Lancet*, **401**, 645-654. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)02600-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)02600-9)
- [7] Muir, K.W., Ford, G.A., Ford, I., Wardlaw, J.M., McConnell, A., Greenlaw, N., *et al.* (2024) Tenecteplase versus Alteplase for Acute Stroke within 4.5h of Onset (ATTEST-2): A Randomised, Parallel Group, Open-Label Trial. *The Lancet Neurology*, **23**, 1087-1096. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(24\)00377-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(24)00377-6)
- [8] Palaiodimou, L., Katsanos, A.H., Turc, G., *et al.* (2024) Tenecteplase vs Alteplase in Acute Ischemic Stroke within 4.5 Hours: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Neurology*, **103**, e209903. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000209903>
- [9] Alamowitch, S., Turc, G., Palaiodimou, L., Bivard, A., Cameron, A., De Marchis, G.M., *et al.* (2023) European Stroke Organisation (ESO) Expedited Recommendation on Tenecteplase for Acute Ischaemic Stroke. *European Stroke Journal*, **8**, 8-54. <https://doi.org/10.1177/23969873221150022>
- [10] Xiong, Y., Li, S., Wang, C., Sun, D., Li, Z., Gu, H., *et al.* (2025) Chinese Stroke Association Guidelines on Reperfusion Therapy for Acute Ischaemic Stroke 2024. *Stroke and Vascular Neurology*, **10**, 527-541. <https://doi.org/10.1136/svn-2024-003977>
- [11] Campbell, B.C., Mitchell, P.J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T.J., Yan, B., *et al.* (2018) Tenecteplase versus Alteplase before Endovascular Thrombectomy (EXTEND-IA TNK): A Multicenter, Randomized, Controlled Study. *International Journal of Stroke*, **13**, 328-334. <https://doi.org/10.1177/1747493017733935>
- [12] Mengozzi, L., Barison, I., Malý, M., Lorenzoni, G., Fedrigo, M., Castellani, C., *et al.* (2024) Neutrophil Extracellular Traps and Thrombolysis Resistance: New Insights for Targeting Therapies. *Stroke*, **55**, 963-971. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.123.045225>
- [13] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., *et al.* (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, **303**, 1532-1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- [14] Hidalgo, A., Libby, P., Soehnlein, O., Aramburu, I.V., Papayannopoulos, V. and Silvestre-Roig, C. (2022) Neutrophil Extracellular Traps: From Physiology to Pathology. *Cardiovascular Research*, **118**, 2737-2753. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab329>
- [15] Brinjikji, W., Madalina Mereuta, O., Dai, D., Kallmes, D.F., Savastano, L., Liu, Y., *et al.* (2021) Mechanisms of Fibrinolysis Resistance and Potential Targets for Thrombolysis in Acute Ischaemic Stroke: Lessons from Retrieved Stroke Emboli. *Stroke and Vascular Neurology*, **6**, 658-667. <https://doi.org/10.1136/svn-2021-001032>
- [16] Kosyakovskiy, J., Rossitto, C.P., Antonios, J.P., Renedo, D., Stapleton, C.J., Sansing, L.H., *et al.* (2025) Clot Composition and Ischemic Stroke Etiology: A Contemporary Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*, **14**, Article 6203. <https://doi.org/10.3390/jcm14176203>
- [17] Frol, S. and Zupan, M. (2025) Thrombus Composition and the Evolving Role of Tenecteplase in Acute Ischemic Stroke. *Journal of Clinical Medicine*, **14**, Article 8675. <https://doi.org/10.3390/jcm14248675>

- [18] He, W., Wu, Z., Liu, Y. and Ye, Z. (2025) Neutrophil Extracellular Traps in Ischemic Stroke: Mechanisms, Clinical Implications, and Therapeutic Potential. *Frontiers in Neurology*, **16**, Article 1641985. <https://doi.org/10.3389/fneur.2025.1641985>
- [19] Li, X., Ma, Y. and Wang, D. (2024) The Role of P-Selectin/PSGL-1 in Regulating Nets as a Novel Mechanism in Cerebral Ischemic Injury. *Frontiers in Neurology*, **15**, Article 1442613. <https://doi.org/10.3389/fneur.2024.1442613>
- [20] Thålin, C., Aguilera, K., Hall, N.W., Marunde, M.R., Burg, J.M., Rosell, A., *et al.* (2020) Quantification of Citrullinated Histones: Development of an Improved Assay to Reliably Quantify Nucleosomal H3cit in Human Plasma. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **18**, 2732-2743. <https://doi.org/10.1111/jth.15003>
- [21] Staessens, S., Vandelanotte, S., François, O., Bouleaux, E., Bretzner, M., Casolla, B., *et al.* (2025) Association between Thrombus Composition and Etiology in Patients with Acute Ischemic Stroke Treated by Thrombectomy. *Stroke*, **56**, 1026-1035. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.124.047092>
- [22] Xu, S., Yang, Z., Jia, J., Zhang, S., Huang, S., Zhang, L., *et al.* (2025) Enhancement of Tenecteplase Thrombolytic Actions Ex Vivo and in Vivo by Deoxyribonuclease I. *Journal of the American Heart Association*, **14**, e039199. <https://doi.org/10.1161/jaha.124.039199>
- [23] Locke, M. and Longstaff, C. (2021) Extracellular Histones Inhibit Fibrinolysis through Noncovalent and Covalent Interactions with Fibrin. *Thrombosis and Haemostasis*, **121**, 464-476. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718760>
- [24] Longstaff, C., Varjú, I., Sótonyi, P., Szabó, L., Krumrey, M., Hoell, A., *et al.* (2013) Mechanical Stability and Fibrinolytic Resistance of Clots Containing Fibrin, DNA, and Histones. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 6946-6956. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.404301>
- [25] Adrover, J.M., del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M.I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L.A., *et al.* (2019) A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity*, **50**, 390-402.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.002>
- [26] Aroca-Crevillén, A., Adrover, J.M. and Hidalgo, A. (2020) Circadian Features of Neutrophil Biology. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article 576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00576>
- [27] Vázquez-Reyes, S., García-Culebras, A., Di, G., De Castro-Millán, F.J., Díaz-Benito, B., Nieto-Vaquero, C., *et al.* (2026) Circadian Control of Neutrophils Drives Collateral Perfusion and Stroke Outcome. *Circulation Research*, **138**, e356438. <https://doi.org/10.1161/circresaha.125.326438>
- [28] Ryu, W.S., Hong, K.S., Jeong, S.W., *et al.* (2022) Association of Ischemic Stroke Onset Time with Presenting Severity, Acute Progression, and Long-Term Outcome: A Cohort Study. *PLOS Medicine*, **19**, e1003910. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003910>
- [29] Reidler, P., Brehm, A., Sporns, P.B., Burbano, V.G., Stueckelschweiger, L., Broocks, G., *et al.* (2023) Circadian Rhythm of Ischaemic Core Progression in Human Stroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **94**, 70-73. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-326072>
- [30] Perez-de-Puig, I., Miró-Mur, F., Ferrer-Ferrer, M., Gelpi, E., Pedragosa, J., Justicia, C., *et al.* (2015) Neutrophil Recruitment to the Brain in Mouse and Human Ischemic Stroke. *Acta Neuropathologica*, **129**, 239-257. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1381-0>
- [31] Neumann, J., Riek-Burchardt, M., Herz, J., Doeppner, T.R., König, R., Hütten, H., *et al.* (2015) Very-Late-Antigen-4 (VLA-4)-Mediated Brain Invasion by Neutrophils Leads to Interactions with Microglia, Increased Ischemic Injury and Impaired Behavior in Experimental Stroke. *Acta Neuropathologica*, **129**, 259-277. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1355-2>
- [32] Di, G., Vázquez-Reyes, S., Díaz, B., Peña-Martínez, C., García-Culebras, A., Cuartero, M.I., *et al.* (2025) Daytime DNase-I Administration Protects Mice from Ischemic Stroke without Inducing Bleeding or tPA-Induced Hemorrhagic Transformation, Even with Aspirin Pretreatment. *Stroke*, **56**, 527-532. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.124.049961>
- [33] Barnes, B.J., Adrover, J.M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A., Cools-Lartigue, J., Crawford, J.M., *et al.* (2020) Targeting Potential Drivers of COVID-19: Neutrophil Extracellular Traps. *Journal of Experimental Medicine*, **217**, e2200652. <https://doi.org/10.1084/jem.20200652>
- [34] Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N. and Wang, Y. (2010) PAD4 Is Essential for Antibacterial Innate Immunity Mediated by Neutrophil Extracellular Traps. *Journal of Experimental Medicine*, **207**, 1853-1862. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
- [35] Lewis, H.D., Liddle, J., Coote, J.E., Atkinson, S.J., Barker, M.D., Bax, B.D., *et al.* (2015) Inhibition of PAD4 Activity Is Sufficient to Disrupt Mouse and Human NET Formation. *Nature Chemical Biology*, **11**, 189-191. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1735>
- [36] Peña-Martínez, C., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., Ostos, F., Hernández-Jiménez, M., Bravo-Ferrer, I., *et al.* (2019) Pharmacological Modulation of Neutrophil Extracellular Traps Reverses Thrombotic Stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Resistance. *Stroke*, **50**, 3228-3237. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.119.026848>

- 
- [37] Cimmino, G., Loffredo, F.S., De Rosa, G. and Cirillo, P. (2023) Colchicine in Athero-Thrombosis: Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 2483. <https://doi.org/10.3390/ijms24032483>
- [38] Kelly, P., Lemmens, R., Weimar, C., Walsh, C., Purroy, F., Barber, M., *et al.* (2024) Long-Term Colchicine for the Prevention of Vascular Recurrent Events in Non-Cardioembolic Stroke (CONVINCE): A Randomised Controlled Trial. *The Lancet*, **404**, 125-133. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(24\)00968-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(24)00968-1)
- [39] Li, J., Meng, X., Shi, F., Jing, J., Gu, H., Jin, A., *et al.* (2024) Colchicine in Patients with Acute Ischaemic Stroke or Transient Ischaemic Attack (CHANCE-3): Multicentre, Double Blind, Randomised, Placebo Controlled Trial. *British Medical Journal*, **385**, e079061. <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-079061>
- [40] Saver, J.L. (2006) Time Is Brain—Quantified. *Stroke*, **37**, 263-266. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000196957.55928.ab>
- [41] Wang, J.D.J., Dong, Y., Yeo, J.Y.P., Teo, K.S.H., Ng, S., Jing, M., *et al.* (2025) Improved Functional Outcomes and Cost Benefits of Door-to-Needle Time under 30 Min in Acute Ischemic Stroke: An Observational Study. *Frontiers in Stroke*, **4**, Article 1583875. <https://doi.org/10.3389/fstro.2025.1583875>
- [42] Zhang, X., Li, Y., Huang, Z., Chen, S., E, Y., Zhang, Y., *et al.* (2023) Association between Citrullinated Histone H3 and White Matter Lesions Burden in Patients with Ischemic Stroke. *Brain Sciences*, **13**, Article 991. <https://doi.org/10.3390/brainsci13070991>
- [43] Man, S., Solomon, N., Mac Grory, B., Alhanti, B., Uchino, K., Saver, J.L., *et al.* (2023) Shorter Door-to-Needle Times Are Associated with Better Outcomes after Intravenous Thrombolytic Therapy and Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. *Circulation*, **148**, 20-34. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.123.064053>