

组织型纤溶酶原激活物在脓毒症相关疾病中的应用及其靶向给药的研究进展

郭飞^{1,2}, 单亮^{1*}

¹青岛大学附属医院重症医学科, 山东 青岛

²青岛大学医学部, 山东 青岛

收稿日期: 2024年3月27日; 录用日期: 2024年4月21日; 发布日期: 2024年4月30日

摘要

脓毒症是由于感染引起的机体反应失调, 进而导致的严重的器官功能障碍, 据估计每年可造成全球约500万人死亡。它是由宿主对感染的反应失调引起的, 主要以炎症反应、免疫功能失调和凝血功能紊乱为特征。目前, 炎症反应和凝血障碍被认为是促进脓毒症和脓毒症休克患者器官功能障碍的两个驱动因素, 且研究显示, 由于凝血功能的异常, 脓症患者体内微循环中常常伴随着微血栓的形成, 加重器官功能障碍的进展。组织型纤溶酶原激活剂是一种溶栓剂, 目前被广泛应用于脑卒中和急性心梗的溶栓治疗, 但其应用受到短半衰期、全身出血风险等副作用的限制, 针对其副作用, 不少学者考虑以靶向给药的方式降低其副作用的限制。本文将对组织型纤溶酶原激活剂在脓毒症相关疾病中的应用及其靶向给药策略进行探讨, 为脓毒症治疗及靶向用药提供新思路。

关键词

脓毒症, 组织型纤溶酶原激活剂, 靶向给药

Advances in the Application of Tissue-Type Plasminogen Activator in Sepsis-Related Diseases and Its Targeted Delivery

Fei Guo^{1,2}, Liang Shan^{1*}

¹Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Mar. 27th, 2024; accepted: Apr. 21st, 2024; published: Apr. 30th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 郭飞, 单亮. 组织型纤溶酶原激活物在脓毒症相关疾病中的应用及其靶向给药的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(4): 2971-2977. DOI: 10.12677/acm.2024.1441379

Abstract

Sepsis is a serious organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, estimated to result in approximately 5 million deaths worldwide annually. It is characterized by dysregulation of the host response to infection, often accompanied by inflammatory response, immune dysfunction and coagulation dysfunction. Currently, inflammation and coagulation are considered as two driving factors promoting organ dysfunction in sepsis and septic shock patients. Studies have shown that sepsis patients often have microthrombi formation in the microcirculation due to abnormalities in coagulation function. Tissue-type plasminogen activator (tPA) is widely used in thrombolytic therapy for acute stroke and acute myocardial infarction, but its application is limited by side effects such as short half-life and systemic bleeding risk. In response to its side effects, many researchers consider targeted drug delivery as a means to reduce its adverse effects. This paper will discuss the application of tissue-type plasminogen activator in sepsis-related diseases and its targeted drug delivery strategies, providing new ideas for sepsis treatment and targeted drug delivery.

Keywords

Sepsis, Tissue-Type Plasminogen Activator, Targeted Delivery

Copyright © 2024 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

脓毒症(Sepsis)是由感染或疑似感染引发的机体反应失调而导致的严重威胁生命的器官功能障碍, 主要以炎症反应、免疫功能失调和凝血功能障碍为特征, 最终可发展为多器官功能障碍综合征(MODS), 导致病人死亡[1]。近年研究表明, 凝血功能障碍在脓毒症发生、发展的过程中具有至关重要作用, 脓毒症的凝血异常范围包含从血小板计数的小幅减少和整体凝血时间的亚临床延长到暴发性弥散性血管内凝血, 显著影响脓毒症病人的临床预后[2]。在脓毒症、炎症或创伤等情况下, 炎性细胞和多种炎症介质的过度释放, 激活凝血系统, 导致发生凝血和纤溶失衡, 进而血栓形成, 大量微血栓形成造成微循环瘀滞, 组织器官缺血缺氧而最终导致多器官功能衰竭[3] [4]。

2. 脓毒症微循环血栓

微循环是维持机体稳态的重要场所, 由小动脉、毛细血管和小静脉组成, 具有实施物质交换, 包括氧输送、溶质交换等重要功能[5]。微循环功能的保持是组织充分氧合的先决条件, 因此也是维持器官功能的主要先决条件。微循环功能障碍既是脓毒症的病理生理学表现, 也是脓毒症发生发展的始动因素之一。这种微循环障碍导致的多器官功能损伤是脓毒症治疗面临的重要挑战之一[6]。传统治疗方法往往难以迅速纠正微循环障碍, 导致脓毒症患者病情迅速恶化, 多器官功能衰竭的风险增加。因此, 了解和研究微循环障碍在脓毒症中的影响, 寻找有效的干预治疗策略, 成为当前脓毒症治疗领域的重要研究方向。

正常人体内凝血和纤溶达到均衡状态, 当脓毒症早期血液高凝及纤溶抑制状态时, 体内凝血级联反应的激活最终导致纤维蛋白聚合成网[7] [8] [9]。凝血酶激活可溶性纤维蛋白原, 促进其聚合成不溶性纤

纤维蛋白网。血小板也被激活进入形成的纤维蛋白网中,在血管系统内形成一个固定的凝块阻挡血液流动。当体内的纤溶酶原接触纤维蛋白后被激活成纤溶酶,便发挥纤溶作用,使血凝块降解。纤溶酶原激活物,如组织型纤溶酶原激活物(tPA),由内皮细胞释放到血液中,并在与纤维蛋白结合后启动这一过程,激活纤溶酶原,纤溶酶原转化为纤溶酶并切割纤维蛋白。但内源性纤溶酶原激活物释放量有限且极易受内源性抑制剂影响,因此将外源性纤溶酶原激活物靶向纤维蛋白进行定向溶栓治疗是一种极佳的治疗策略,因为它模拟了人体对凝血的自然调节且达到了定向输送的目的。

3. 组织型纤溶酶原激活剂

3.1. 组织型纤溶酶原激活剂(tPA)的结构

组织型纤溶酶原激活剂(tPA)是一种分子量为 63 kDa 的丝氨酸蛋白酶,可将纤溶酶原转化为纤溶酶,发挥纤溶作用,溶解血栓的主要结构,进而发挥溶栓作用[10] [11]。tPA 由内皮细胞和肝细胞在血液中释放,但也由包括 T 细胞和单核细胞在内的各种类型的免疫细胞产生[12] [13]。除了参与纤溶环节,在纤维蛋白降解过程中发挥作用外,tPA 也是一种有效的炎症调节剂,能调节各种疾病条件下组织损伤的炎症反应[10] [12] [14]。例如,在脑缺血模型中,tPA 促进小胶质细胞的激活和中性粒细胞的募集[15] [16]。在肾脏炎症模型中,tPA 刺激巨噬细胞中的 NF- κ B 通路,导致其在肾实质中的浸润和激活[17]。从根本上来说是 tPA 通过介导 T 细胞增殖、激活和细胞因子的产生,以及通过塑造巨噬细胞和树突状细胞的功能,作为适应性免疫反应的激活因子。

3.2. tPA 在脓毒症相关疾病中的应用研究

组织型纤溶酶原激活剂作为一种溶栓药物,临床上广泛应用于心脑血管系统的溶栓治疗,旨在及早恢复心脑血管灌注,减轻器官损伤,但也有不少学者探究其在其他炎症相关性疾病中的作用,并通过一系列实验及观察与统计对此想法进行探索和验证。Li T 等人通过对脓毒症小鼠的研究发现 HSF1 可以通过直接上调内源性 tPA 来抑制凝血活性和微血栓形成,调控凝血和纤溶的失调,从而对脓毒症小鼠的多器官功能障碍发挥保护作用[18]。其通过组织病理学分析和血浆损伤标志物检测,发现 HSF1 (-) 的脓毒症小鼠的肺、肝、肾的组织损伤比 HSF1 (+) 小鼠更明显,这验证了无法上调内源性 tPA 含量的脓毒症小鼠脏器损伤更为严重,即在脓毒症中,内源性 tPA 的上调可以有效抑制脓毒症各脏器损伤,有效改善预后。究其原因,在脓毒症中许多炎症因子会减少 tPA 的产生,增加血管内皮中纤溶酶原激活剂抑制剂-1 的产生。当 tPA 的表达被抑制时,纤溶系统功能受损导致凝血活性增加和纤维蛋白沉积增加,从而加重脓毒症中 DIC 的形成和多器官功能障碍。Rosemarijin 等人也通过 tPA 基因缺陷小鼠研究了 tPA 在大肠杆菌诱导的腹腔感染所致脓毒症中的作用[19]。研究结果首次表明,内源性 tPA 的生成是小鼠机体针对脓毒症而产生的保护性免疫反应的一部分。R Renckens 等研究者通过对肺炎克雷伯菌肺炎的小鼠接种表达人组织型纤溶酶原激活剂的复制缺陷腺病毒载体或对照载体观察发现,用组织型纤溶酶原激活剂载体处理的小鼠表现出较少的细菌生长和传播,减轻了远处器官损伤并降低了死亡率[20]。这些数据表明,肺部纤溶酶原激活物活性的局部升高可提高宿主对严重革兰氏阴性菌肺炎和败血症的防御能力。此外,H. Akol 等人也曾报道过一例由重组组织型纤溶酶原激活剂成功治疗暴发性肺炎球菌脓毒症的病例[21]。

除了观察记录 tPA 在动物机体炎症反应中的作用,也有不少学者关注了临床上 tPA 的使用对严重感染患者疾病进展中发挥的作用。在一篇描述性研究中[22],一名患有暴发性脑膜炎球菌血症、难治性休克和多器官衰竭的婴儿患者在院期间,除了接受标准的积极 ICU 护理外,还在 4 小时内接受了总剂量为 1.25 mg/kg 的重组组织纤溶酶原激活剂静脉输注治疗,在静脉输注重组组织型纤溶酶原激活剂前和输注完成

后 4 小时分别记录心率、动脉血压、尿量和动脉血碱剩余(反映代谢性酸中毒的严重程度)等指标, 还比较了重组组织型纤溶酶原激活剂输注前后维持患者血流动力学状态稳定所需的外源性血管活性药和正性肌力药的用量, 并对患者外周灌注状态进行观察记录。对比发现, 用药后患者血流动力学、尿量和代谢性酸中毒显著改善, 并且, 重组组织型纤溶酶原激活剂输注后皮肤灌注增加。因此可以认为输注重组组织型纤溶酶原激活剂可有效改善脓毒症患者器官灌注和心脏功能。

Zenz 等人多年前在一项多中心、回顾性案例研究中观察重组组织型纤溶酶原激活剂对严重脑膜炎球菌败血症儿童的治疗效果[23]。其中在 62 例患者中, 5 例发生脑出血, 脑出血的高发生率引起了研究者对暴发性脑膜炎球菌血症儿童应用 tPA 安全性的担忧。同时由于重症患者缺乏对照组, 该研究未对 tPA 的疗效做出确切回答, 由此看出, tPA 全身应用的高出血并发症是该药不可忽视的严重并发症, 若将其用于脓毒症患者, 这将是亟待解决的药物副作用。

4. 靶向给药策略的研究进展

自 1996 年以来, 重组组织型纤溶酶原激活剂(rtPA)是美国食品和药物管理局(FDA)批准的唯一用于治疗缺血性中风的治疗药物[24]。静脉注射重组人组织型纤溶酶原激活剂(rtPA), 阿替普酶, 第二代溶栓药物的代表, 在目前的管理指南的临床实践中高度推荐, 广泛应用于脑卒中和急性心梗的溶栓治疗。然而, 严格的临床适应症限制了其实际应用。在这些限制中, 主要的限制是治疗窗口期狭窄, 从症状出现到治疗通常小于 4.5 小时。此外, 目前的 rtPA 药物的半衰期极短, 约为 4~6 min, 主要是由于循环中存在快速作用的内源性抑制剂, 如纤溶酶原激活物抑制剂-1 [25]。因此, 为了维持血药浓度实现有效的溶栓, 临床仍然采取首次大剂量注射, 后持续静脉输注维持的用药方式。除此之外其全身出血的并发症, 尤其是颅内出血, 最易危及生命[26]。因此我们研究的重点集中在提高 tPA 的有效性, 以提高再灌注成功率和安全性, 减少严重出血发作的风险。因此, 开发一种新型的能够提高溶栓效率, 降低出血性转化风险, 扩大 tPA 治疗时间窗的溶栓治疗方法至关重要, 靶向溶栓策略得以映入眼帘。

纳米材料靶向溶栓的目的是保护和延长 tPA 的循环时间, 以减少总剂量, 精确靶向血栓部位, 并以可控的方式提高溶栓疗效, 以减少脱靶效应和出血性并发症。此外, 还应考虑降低应用材料的毒性、优越的生物相容性、非免疫原性和可应用材料的生物降解性。理想的溶栓纳米载体应具有以下特点: 1) 良好的生物相容性、无毒、非免疫原性、可生物降解; 2) 对溶栓药物活性无不良影响; 3) 延长药物半衰期, 避免免疫系统快速清除; 4) 保护溶栓药物免受酶降解; 5) 优选附着于血栓; 6) 血栓可控释放; 7) 渗透到血栓中。药物传递系统(DDS), 包括靶向和刺激反应的纳米载体, 在精确给药和释放方面具有独特的优势。靶向纳米载体专注于通过纳米载体上的配体与特定区域过表达的受体之间的高亲和力、生物模拟纳米载体的固有倾向或外部磁场的引导, 将药物传递到特定的位置。刺激响应纳米载体的特征则是通过对内部或外部刺激, 如超声、磁场、PH, 在特定的位置释放药物。同时, 特异性刺激响应纳米载体可以避免药物在体循环过程中的抗原暴露, 从而维持生物化合物的活性, 同时避免其对正常器官/组织的副作用[27]。以下着重介绍三类组织型纤溶酶原激活剂靶向递送方式。

4.1. 超声辅助介导的靶向传递

Correa-Paz 等人合成了可以利用超声控制重组组织型纤溶酶原激活剂传送的 CaCO_3 聚合物胶囊[28]。并且结果表明, 重组组织型纤溶酶原激活剂在包封后不影响其自身溶栓活性, 且能有效避免进入体循环后内源性失活, 因此经过体外超声引导和刺激释放后重组组织型纤溶酶原激活剂分解血凝块的效果得到提高。此外, 实验验证, 胶囊传递相比非胶囊传递方式可以大大延长了重组组织型纤溶酶原激活剂在小鼠体内的半衰期和溶栓活性。

4.2. 磁力引导的靶向传递

磁引导靶向是另一种潜在的物理策略, 多位学者已成功验证了可以通过应用外部磁场操纵携带药物的磁性纳米颗粒(MNPs), 实现定点特异性靶向[29]-[35]。Yang 等人将 rtPA 与涂有聚[苯胺-CO-N-(1-1-丁酸)苯胺]的四氧化三铁 MNPs 结合, 用于靶向溶栓。经体外实验检验, 该纳米制剂在体外提高了溶栓效果, 减少了血凝块溶解时间(从 39.2 ± 3.2 min 到 10.8 ± 4.2 min) [36]。此外, 用常规 rtPA 用量 20% 的剂量与磁性纳米载体相结合, 便可以在无血液毒性的情况下溶解血栓、恢复血流。Chen 等人实现了构造壳聚糖 MNP 纳米复合材料, 且证实了类似的溶栓效果(仅为常规 rtPA 剂量的 20%) [30]。磁引导靶向材料除了可以提高靶向能力外, Hu 等学者发现还可以利用磁力使磁性纳米复合材料产生机械拖力, 帮助穿透血凝块, 从而提高血栓溶解效率[32] [35] [37]。Hu 等人将组织型纤溶酶原激活剂纳入多孔磁性 Fe_3O_4 微棒(tPA-MRs)中, 进行缺血性卒中小鼠模型的靶向溶栓实验验证。他们证明, 在外部磁场的帮助下, tPA-MRs 可以靶向远端大脑动脉, 并通过 tPA 溶解血栓(化学溶解)和旋转 MRs(机械溶解), 以更低的 tPA 浓度和更短的时间内完成溶栓。

4.3. 配体介导的靶向

与功能配体结合也是靶向用药中高度通用的策略, 可以提高纳米载体配体和受体分子之间的特异性靶向性。功能配体一般可分为多肽、抗体和多糖等。在纳米技术辅助溶栓领域, 这种靶向策略得到了广泛的应用。与功能配体的结合在理论上可能提供了一种靶向的更特异性的结合特性, 从而局部提高溶栓效果, 最小化所需的总剂量, 减少出血性风险。其中, 活化的血小板和纤维蛋白特异性配体被广泛用为靶向递送策略[38]。

5. 未来研究方向

脓毒症是重症医学领域的一大难题, 耗费医疗费用巨大, 是引发重症疾病和死亡的主要原因。脓毒症凝血病的发病机制涉及一系列复杂的细胞、免疫及体液调节相互作用, 其中微循环功能障碍既是脓毒症的病理生理表现, 也是脓毒症发生发展的始动因素之一。在过去的 20 年里, 重组组织型纤溶酶原激活剂被 FDA 批准用于临床溶栓后, 通过密集的合作工作, 进行了各种尝试, 优化溶栓药物的给药方式, 为广泛的临床应用铺平道路。随着纳米技术的出现, 一系列促进溶栓的靶向传递策略和构思被接连提出, 包括保护和延长溶栓剂的循环时间, 精确靶向血栓的部位, 药物缓释等, 以提高溶栓疗效, 减少用药剂量和出血并发症。据此我们构想以靶向 tPA 策略治疗脓毒症微循环血栓, 这将为治疗脓毒症凝血病提供新思路, 然而目前在脓毒症靶向治疗微循环血栓方面的研究尚无明确报道, 该思路需要更多、更可靠、更深入的研究来验证。

参考文献

- [1] Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., et al. (2016) Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *JAMA*, **315**, 762-774. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>
- [2] Van Der Poll, T., Schultz, M. and Levi, M. (2013) Sepsis and Thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **39**, 559-566. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343894>
- [3] Colucci, M., Semeraro, F., Ammollo, C., et al. (2015) Coagulopathy of Acute Sepsis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **41**, 650-658. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1556730>
- [4] Giustozzi, M., Ehrlinder, H., Bongiovanni, D., et al. (2021) Coagulopathy and Sepsis: Pathophysiology, Clinical Manifestations and Treatment. *Blood Reviews*, **50**, Article ID: 100864. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100864>
- [5] Ince, C. (2005) The Microcirculation Is the Motor of Sepsis. *Critical Care*, **9**, S13-S19. <https://doi.org/10.1186/cc3753>
- [6] Walborn, A., Rondina, M., Mosier, M., et al. (2019) Endothelial Dysfunction Is Associated with Mortality and Severity

- of Coagulopathy in Patients with Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, **25**. <https://doi.org/10.1177/1076029619852163>
- [7] Iba, T. and Levy, J.H. (2018) Inflammation and Thrombosis: Roles of Neutrophils, Platelets and Endothelial Cells and Their Interactions in Thrombus Formation during Sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **16**, 231-241. <https://doi.org/10.1111/jth.13911>
- [8] Evans, C.E., Spier, A.B. and Zhao, Y.Y. (2018) Sepsis-Induced Thrombus Formation and Cell-Specific HIFs. *Thrombosis Research*, **171**, 187-189. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.08.017>
- [9] Iba, T., Levi, M. and Levy, J.H. (2020) Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **46**, 89-95. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1694995>
- [10] Seillier, C., Hélie, P., Petit, G., et al. (2022) Roles of the Tissue-Type Plasminogen Activator in Immune Response. *Cellular Immunology*, **371**, Article ID: 104451. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451>
- [11] Novokhatny, V.V., Ingham, K.C. and Medved, L.V. (1991) Domain Structure and Domain-Domain Interactions of Recombinant Tissue Plasminogen Activator. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 12994-13002. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98794-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98794-6)
- [12] Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., et al. (2016) The Plasminogen Activation System in Neuroinflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1862**, 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011>
- [13] Van Zonneveld, A.J., Veerman, H., Macdonald, M.E., et al. (1986) Structure and Function of Human Tissue-Type Plasminogen Activator (T-PA). *Journal of Cellular Biochemistry*, **32**, 169-178. <https://doi.org/10.1002/jcb.240320302>
- [14] Lin, L. and Hu, K. (2014) Tissue Plasminogen Activator and Inflammation: From Phenotype to Signaling Mechanisms. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, **3**, 30-36.
- [15] Zhang, C., An, J., Strickland, D.K., et al. (2009) The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Microglial Activation in the Ischemic Brain. *The American Journal of Pathology*, **174**, 586-594. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080661>
- [16] Uhl, B., Zuchtriegel, G., Pühr-Westerheide, D., et al. (2014) Tissue Plasminogen Activator Promotes Postischemic Neutrophil Recruitment via Its Proteolytic and Nonproteolytic Properties. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **34**, 1495-1504. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303721>
- [17] Lin, L., Wu, C. and Hu, K. (2012) Tissue Plasminogen Activator Activates NF- κ B through a Pathway Involving Annexin A2/CD11b and Integrin-Linked Kinase. *Journal of the American Society of Nephrology*, **23**, 1329-1338. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011111123>
- [18] Xiao, X., Zhang, H., Chen, H., et al. (2020) HSF1 Alleviates Microthrombosis and Multiple Organ Dysfunction in Mice with Sepsis by Upregulating the Transcription of Tissue-Type Plasminogen Activator. *Thrombosis and Haemostasis*, **121**, 1066-1078. <https://doi.org/10.1055/a-1333-7305>
- [19] Renckens, R., Roelofs, J., Florquin, S., et al. (2006) Endogenous Tissue-Type Plasminogen Activator Is Protective during Escherichia Coli-Induced Abdominal Sepsis in Mice. *The Journal of Immunology*, **177**, 1189-1196. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1189>
- [20] Renckens, R., Roelofs, J., Stegenga, M.E., et al. (2008) Transgenic Tissue-Type Plasminogen Activator Expression Improves Host Defense during Klebsiella Pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 660-668. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02892.x>
- [21] Akol, H., Boon, E., Van Haren, F., et al. (2002) Successful Treatment of Fulminant Pneumococcal Sepsis with Recombinant Tissue Plasminogen Activator. *European Journal of Internal Medicine*, **13**, 389-391. [https://doi.org/10.1016/S0953-6205\(02\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0953-6205(02)00095-X)
- [22] Aiuto, L.T., Barone, S.R., Cohen, P.S., et al. (1997) Recombinant Tissue Plasminogen Activator Restores Perfusion in Meningococcal Purpura Fulminans. *Critical Care Medicine*, **25**, 1079-1082. <https://doi.org/10.1097/00003246-199706000-00028>
- [23] Zenz, W., Muntean, W., Gallistl, S., et al. (1995) Recombinant Tissue Plasminogen Activator Treatment in Two Infants with Fulminant Meningococemia. *Pediatrics*, **96**, 144-148. <https://doi.org/10.1542/peds.96.1.144>
- [24] Powers, W.J., Rabinstein, A.A., Ackerson, T., 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>
- [25] Colucci, M., Paramo, J.A. and Collen, D. (1986) Inhibition of One-Chain and Two-Chain Forms of Human Tissue-Type Plasminogen Activator by the Fast-Acting Inhibitor of Plasminogen Activator *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **108**, 53-59.
- [26] Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., et al. (2008) Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine*, **359**, 1317-1329. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>

-
- [27] Zhang, S., Zhou, Y., Li, R., *et al.* (2022) Advanced Drug Delivery System against Ischemic Stroke. *Journal of Controlled Release*, **344**, 173-201. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02.036>
- [28] Correa-Paz, C., Navarro Poupard, M.F., Polo, E., *et al.* (2019) *In Vivo* Ultrasound-Activated Delivery of Recombinant Tissue Plasminogen Activator from the Cavity of Sub-Micrometric Capsules. *Journal of Controlled Release*, **308**, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.017>
- [29] Ma, Y.H., Wu, S.Y., Wu, T., *et al.* (2009) Magnetically Targeted Thrombolysis with Recombinant Tissue Plasminogen Activator Bound to Polyacrylic Acid-Coated Nanoparticles. *Biomaterials*, **30**, 3343-3351. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.034>
- [30] Chen, J.P., Liu, C.H., Hsu, H.L., *et al.* (2016) Magnetically Controlled Release of Recombinant Tissue Plasminogen Activator from Chitosan Nanocomposites for Targeted Thrombolysis. *Journal of Materials Chemistry B*, **4**, 2578-2590. <https://doi.org/10.1039/C5TB02579F>
- [31] Tadayon, A., Jamshidi, R. and Esmaeili, A. (2016) Targeted Thrombolysis of Tissue Plasminogen Activator and Streptokinase with Extracellular Biosynthesis Nanoparticles Using Optimized Streptococcus Equi Supernatant. *International Journal of Pharmaceutics*, **501**, 300-310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.011>
- [32] Hu, J., Huang, S., Zhu, L., *et al.* (2018) Tissue Plasminogen Activator-Porous Magnetic Microrods for Targeted Thrombolytic Therapy after Ischemic Stroke. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 32988-32997. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b09423>
- [33] De Saint Victor, M., Barnsley, L.C., Carugo, D., *et al.* (2019) Sonothrombolysis with Magnetically Targeted Microbubbles. *Ultrasound in Medicine and Biology*, **45**, 1151-1163. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.014>
- [34] Liu, C.H., Hsu, H.L., Chen, J.P., *et al.* (2019) Thrombolysis Induced by Intravenous Administration of Plasminogen Activator in Magnetoliposomes: Dual Targeting by Magnetic and Thermal Manipulation. *Nanomedicine*, **20**, Article ID: 101992. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.014>
- [35] Zhang, B., Kim, H., Wu, H., *et al.* (2019) Sonothrombolysis with Magnetic Microbubbles under a Rotational Magnetic Field. *Ultrasonics*, **98**, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.06.004>
- [36] Yang, H.W., Hua, M.Y., Lin, K.J., *et al.* (2012) Bioconjugation of Recombinant Tissue Plasminogen Activator to Magnetic Nanocarriers for Targeted Thrombolysis. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 5159-5173. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32939>
- [37] Huang, L., Wang, J., Huang, S., *et al.* (2019) Polyacrylic Acid-Coated Nanoparticles Loaded with Recombinant Tissue Plasminogen Activator for the Treatment of Mice with Ischemic Stroke. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **516**, 565-570. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.079>
- [38] Ma, H., Jiang, Z., Xu, J., *et al.* (2021) Targeted Nano-Delivery Strategies for Facilitating Thrombolysis Treatment in Ischemic Stroke. *Drug Delivery*, **28**, 357-371. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1879315>