

MECHANIKAI STRESSZ ÉS NEUTROFIL EXTRACELLULÁRIS CSAPDÁK MINT A TROMBOLÍZIS ÚJABB GÁTJAI

Doktori tézisek

Dr. Varjú Imre

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

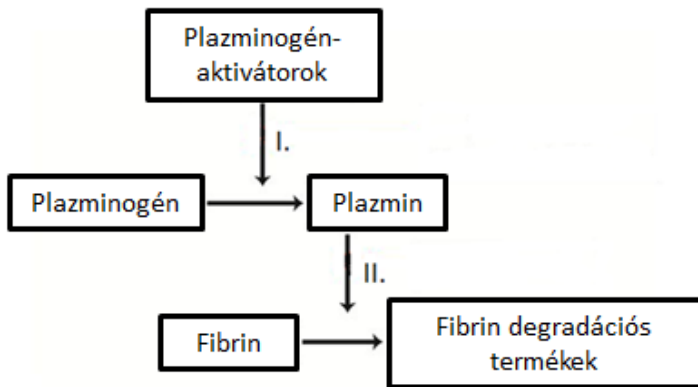


- Konzulens:** Dr. Kolev Kraszimir, egyetemi tanár, az MTA doktora
- Hivatalos bírálók:** Dr. Hársfalvi Jolán, szaktanácsadó, az MTA doktora
Dr. Nagy Béla, egyetemi tanársegéd, PhD
- A szigorlati bizottság elnöke:** Dr. Benyó Zoltán, egyetemi tanár, az MTA doktora
- A szigorlati bizottság tagjai:** Dr. Bodó Imre, egyetemi docens, PhD
Dr. Müllner Nándor, egyetemi docens, PhD

Budapest, 2014

BEVEZETÉS

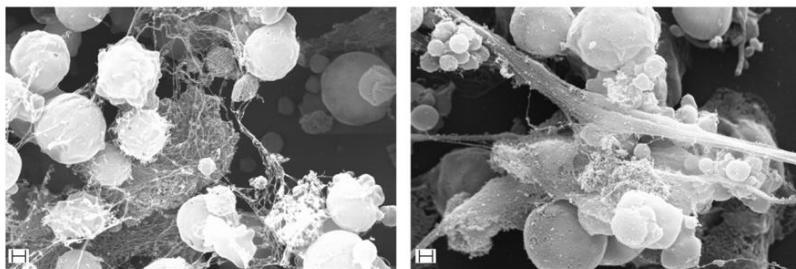
A WHO (World Health Organisation) statisztikái szerint napjainkban a kardio- és cerebrovaszkuláris megbetegedések felelősek a halálozások mintegy harmadáért. Ezen állapotok hátterében a fibrinhálóból, valamint szolúbilis- és sejtes vérkomponensekből felépülő trombusok kialakulása áll, amelyek az érlument elzárva a megfelelő szövet oxigén- és tápanyaghiányához, végső soron károsodásához vezetnek. A trombolízis, mint lehetséges terápiás eszköz célja a keringés az alvadék fibrinvázának lebontásán (1. ábra) keresztül történő helyreállítása.



1. ábra. A fibrinolízis folyamatának lépései. I.: az inaktív prekursor plazminogén aktivációja (pl. a terápiás és fiziológiás szempontból legrelevánsabb, ún. szöveti típusú plazminogén-aktivátor, tPA által). II.: fibrin degradáció az aktív enzim, plazmin által.

A terápiás trombolízis azonban hosszabb távon sok esetben alacsony hatásfokúnak mutatkozik, mellékhatásként pedig magában rejti a vérzés veszélyét. A jelenlegi protokollok hatékonyságának növeléséhez elengedhetetlen a trombusok feloldásában szerepet játszó enzimek hatékonyságát befolyásoló tényezők feltérképezése.

Jelen disszertáció fókuszában két tényező áll: egyrészt a keringő vér által az érpályán belül elhelyezkedő trombusra kifejtett *mechanikai stressz*, másrészt a neutrofilekből gyulladásszerű stimulusok hatására kiszabaduló, főként DNS-ből, hisztonokból, és granulás enzimekből álló *neutrofil extracelluláris csapdák* (NETek, 2. ábra), amelyek a keringésbe kerülve a véralvadási rendszert aktivációján keresztül trombusképződéshez vezethetnek.



2. ábra. SEM (pásztázó elektronmikroszkópos) felvételek aktivált neutrofil granulocitákból származó neutrofil extracelluláris csapdákról. Lépték: 1 μ m.

CÉLKITŰZÉSEK

A mechanikai stressz szerepének vizsgálata:

- Az intravaszkuláris mechanikai erők hatásainak vizsgálata betegekből műtéti úton eltávolított trombusokon
- Olyan modellrendszer megalkotása, amelyben a fibrinszerkezet közelíti az egyes trombusok keringésnek kitett felszíni régióiban észlelt struktúrát
- A mechanikai stressznek kitett fibrin szerkezeti jellemzése, valamint lítikus érzékenységének vizsgálata

A NET-komponensek szerepének vizsgálata :

- Ex vivo artériás trombusok DNS- és hisztontartalmának vizsgálata
- NET komponensek fibrinszerkezetre kifejtett hatásának vizsgálata „tisztá” rendszerben, illetve komplexebb plazma rendszerben (fibrin-, illetve plazmaalvadékokban).
- Az alvadék mechanikai tulajdonságainak jellemzése DNS és hisztonok jelenlétében
- A fibrinolízis folyamatának vizsgálata plazmaalvadékokban DNS és hisztonok, illetve neutrofilekből származó NETek jelenlétében

MÓDSZEREK

Betegek

13 különböző betegből eltávolított trombus került be az itt közölt vizsgálatokba. A betegek sem veleszületett, sem szerzett trombofiliában nem szenvedtek, és a trombektómia idején heparin kezelésben részesültek. A páciensek írásos beleegyező nyilatkozatot adtak, a vizsgálati protokollt az intézeti és a regionális etikai tanács jóváhagyta.

Pásztázó elektronmikroszkópia

A betegekből eltávolított trombusokat, valamint a fibrin- és plazmaalvadékokat glutáraldehiddel fixáltuk, majd dehidráltuk, amit kritikus pont szárítás követett. A vizsgálat előtt a mintákat arannyal vontuk be, és EVO 40 pásztázó elektronmikroszkóp alatt vizsgáltuk. A fibrinszálak átmérőjét és a rendszer pórusméreteit a Matlab R2010a 7.0 Image Processing TOOLBOX segítségével határoztuk meg.

Immunhisztokémia

A trombusok fagyasztva töréses metszeteit lizinnel bevont tárgylemezekre helyeztük, acetonnal fixáltuk, szárítottuk, majd bovin szérum albuminnal blokkoltuk. Mosást követően TOTO-

3[®] festéket alkalmaztunk a DNS kimutatására. Az immunfestés során a metszeteket humán fibrin elleni monoklonális egér, valamint humán hiszton H1 elleni nyúl antitesttel inkubáltuk, amit fluoreszcens kecske anti-egér-, illetve kecske anti-nyúl antitestkezelés követett. A felvételeket 20x1.4 objektívvel felszerelt Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük.

Alvadék-permeabilitás vizsgálata

Fibrinogén vagy rekalcifikált humán plazma \pm DNS/hiszton keverékét trombinnal alvasztottuk műanyag pipettahegyekben. Ezt követően 150 mM NaCl-t tartalmazó 10 mM 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etán-szulfonsav (HEPES) puffert (pH 7.4) helyeztünk az alvadékra, és a nyomást állandón tartottuk.

A K_s permeabilitási konstans a $K_s = \frac{Q \cdot L \cdot \eta}{t \cdot A \cdot \Delta P}$ egyenlet alapján

határoztuk meg, amelyben Q = az átfolyó puffer volumene (cm^3); η = a puffer viszkozitása ($\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$); L = az alvadék hossza (cm); A = az alvadék átlagos keresztmetszetének területe (cm^2); t = idő (s); ΔP = nyomáscsökkenés ($\text{N} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Fibrinalvadékok reológiai tulajdonságainak meghatározása

DNS-t \pm hisztont tartalmazó fibrinogén oldathoz trombintadtunk. A keveréket HAAKE RheoStress 1 oszcillációs reométer 37 °C-on tartott mérőplate-jére helyeztük. A tárolási (G') és veszteségi modulus (G'') meghatározását 15 percen át 1 Hz mellett végeztük HAAKE RheoWin data manager software 3.50.0012 segítségével. Ezután a 15 perces alvadási fázis után szintén meghatároztuk ugyanezen alvadékok folyáshatárát.

Izoterm titrációs kalorimetria (ITC)

A DNS/hisztin és fibrin degradációs termékek (FDPk)/plazminogén/fibrinogén kölcsönhatásaival járó entalpiaváltozást VP-ITC mikrokaloriméterrel határoztuk meg. A fehérjéket a műszer fecskendőjébe juttattuk, amely a mérés során megfelelő időközönként azonos mennyiségeket injektált a DNS-t/hisztin tartalmazó cellába, és az ehhez társuló hőváltozásokat a műszer rögzítette. Ezen adatokból az ITC Data Analysis software 7.0. verziójának segítségével számítottuk ki az intermolekuláris kölcsönhatásokat jellemző paramétereket.

Konfokális mikroszkópia

Fibrinogén vagy rekalifikált humán plazma, Alexa Fluor® 546-konjugált fibrinogén és plazminogén keverékét trombinnal alvasztottuk IBIDI VI 0.4 μ -lemezek csatornáiban.. Az alvadék egyes esetekben humán neutrofil DNS-t és/vagy hisztont tartalmazott. Ezután tPA-GFP-t vagy plazminogénnel kiegészített tPA-YFP-t juttatunk az alvadék széléhez, és a keletkező plazmin által katalizált fibrinolízis folyamatát a folyadék-fibrin határfelszín mozgásának követésével vizsgáltuk. A felvételeket 20x1.4 objektívvel felszerelt Zeiss LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük.

Alvadékfelszíni plazminogén-aktiváció vizsgálata

Rekalifikált plazma, trombin \pm DNS és/vagy hiszton keverékét 96-lyukú mérőplate-ek well-jeibe mértük. Az alvadást követően tPA és Spectrozyme-Plasmin (SPPL, kromogén plazmin szubsztrát) keverékét juttatuk az alvadék felszínére. A keletkező plazmin által generált p-nitroanilin abszorbanciáját 405 nm-en követtük (A_{405}) Zenith 200rt spektrofotométer segítségével.

A nyújtott szubsztráton zajló plazminogén-aktiváció követéséhez plazminogént tartalmazó fibrinalvadékokat

hoztunk létre elasztikus szilikoncsövekben. A csövek megnyújtása során a nyújtott fibrin körül létrejött folyadékfázist eltávolítottuk, és helyére tPA-t juttattunk, majd 37 °C-on megfelelő ideig inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével a folyadék fázist eltávolítottuk, térfogatát megmértük, és meghatároztuk a keletkezett plazmin koncentrációját SPPL segítségével.

Turbidimetria

DNS-t \pm hisztont vagy (aktivált) granulocitákat tartalmazó rekalifikált plazmát trombinnal alvasztottunk 96-lyukú microplate-ek well-jeiben. A lízist tPA hozzáadásával indítottuk, és a 340 nm-n mért abszorbancia mérésével követtük nyomon 37 °C-on Zenyth 200r spektrofotométer segítségével. A maximális abszorbancia felére (T50), illetve 10%-ra (T10) csökkenéséhez szükséges időértékeket használtuk fel a fibrinolízis kvantitatív jellemzésére.

Lízis vizsgálata IBIDI mikrolemezekben

DNS/hisztin, trombin, és rekalifikált plazma keverékét IBIDI lemezek csatornáiba juttattuk. Az alvadást követően az alvadék

széléhez plazmint adtunk, és a lízis folyamatát a fibrin/folyadék határfelszín szkennelésével követtük.

Enzim-inaktiváció vizsgálata

Plazmin, CaCl_2 , defibrinogénált plazma \pm DNS keverékét 10 másodpercig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd az elegyhez SPPL-t adtunk. Az abszorbancia-változást 405 nm-n követtük Beckman DU 7500 spektrofotométer segítségével.

Antitrombin, trombin, hiszton/DNS \pm heparin keverékét inkubáltuk szobahőmérsékleten. A reziduális trombin-indukálta alvadási időt KC-1A koagulométerrel határoztuk meg 37 °C-on, fibrinogén hozzáadását követően.

Statisztikai módszerek

A fibrinszálmérő és pórusméret empirikus adathalmazaira teoretikus eloszlásgörbéket illesztettünk, és ezeket Kuiper's teszt és Monte Carlo módszerek segítségével hasonlítottuk össze. Az itt közölt munka további eredményeinek statisztikai elemzésére Kolmogorov–Smirnov tesztet alkalmaztuk (Statistical TOOLBOX 7.3, Matlab), $p < 0.05$ értékeit tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

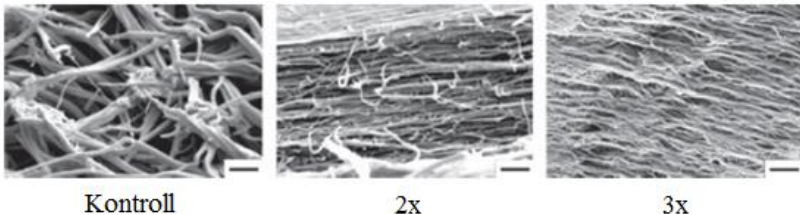
EREDMÉNYEK

Mechanikai stressznek kitett fibrin vizsgálata

Ex vivo trombusok és nyújtott fibrin szerkezeti vizsgálata

Míg a trombusok belső régióiban random fibrinhálózat volt megfigyelhető, 4 esetben a felszíni régiókon a szálak longitudinális elrendeződése mutatkozott, ami szűkebb pórusok megjelenésével, valamint a szálak transzverzális tömörülésével járt együtt. A SEM felvételek morfometriai analízise megmutatta, hogy a szálátmérők és a pórusméretek értékei egyaránt szignifikánsan alacsonyabbak voltak a központi trombus-régiókban mértékhez képest.

Mivel az általunk létrehozott fibrin szálelrendeződése nyújtás hatására hasonló tendenciát mutatott (mind a medián szálátmérő, illetve pórussterület csökkent, ld. 3. ábra), nyújtott fibrint alkalmaztunk modellrendszerként a mechanikai stressz fibrinszerkezetre-, illetve a fibrin lítikus érzékenységére kifejtett hatásainak vizsgálatára.



3. ábra. Fibrinalvadékok SEM felvételei. A nyújtás mértékét feltüntettük. Lépték: 2 μm .

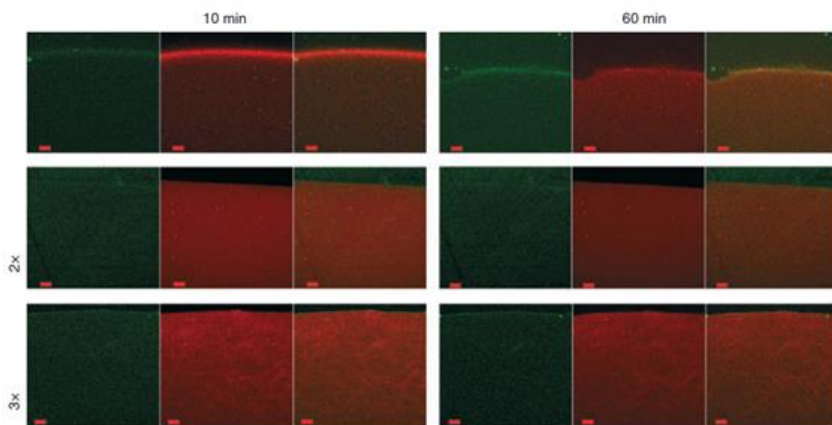
Fibrinolízis nyújtott szubsztráton

A tPA-indukált plazminkeletkezés 2-3-szoros csökkenést mutatott nyújtott (plazminogént is tartalmazó) templáton, nyújtatlan kontrollhoz viszonyítva. SPPL jelenlétében (amely molekulaméreténél fogva képes az alvadékba diffundálni) a detektált plazminaktivitás szintén alacsonyabb volt nyújtott szubsztrát esetében, ami azt mutatja, hogy a csökkent plazminkeletkezés a plazminogén-aktiváció megváltozása (tehát nem esetleges plazminretenció) miatt következett be. A nyújtott alvadék lízise során az FDP-felszabadulás sebessége szintén alacsonyabb volt nyújtatlan kontrollhoz képest.

A plazmin általi fibrinemésztés szeparált vizsgálatát plazminogén-mentes fibrinalvadékokon végeztük. A nyújtatlan kontroll esetében 45 perc plazmin általi emésztés után számos elhasított fibrinszál mutatkozott, míg nyújtott fibrin esetében ezekből kevesebb volt megfigyelhető.

A nyújtás indukálta, fibrinolízissel szembeni ellenállás mechanizmusát konfokális mikroszkópia segítségével közelítettük meg (4. ábra). Plazminogént tartalmazó fluoreszcens fibrin esetében a felszínre mért tPA-GFP egy jól elhatárolt zónában néhány perc alatt feldúsult, majd a keletkező plazmin által indukált emésztés során ez a határréteg nyújtatlan kontroll esetén 50 perc alatt mintegy 75 μm -t haladt, míg

nyújtott alvadékban ez idő alatt detektálható mértékű frontmozgás nem volt tapasztalható. Mindezek alapján a mechanikai stressznek kitett fibrin ultrastruktúrájának megváltozása következtében lecsökkent tPA-kötési kapacitás, illetve hátráltatott tPA-penetráció állhat.

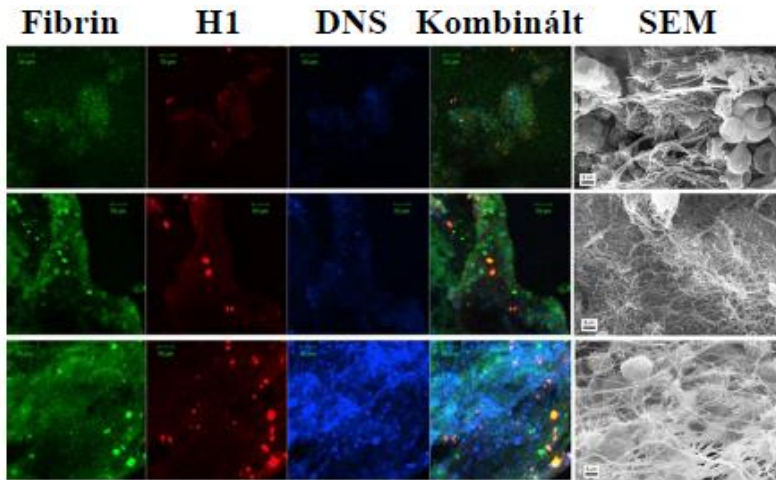


4. ábra. Fibrinolízis konfokális mikroszkóp alatt. Fibrinogén (melynek 1%-a Alexa546-al jelzett) és plazminogén keverékét trombinnal alvasztottuk, és a jelzett mértékben megnyújtottuk (felső sor: nyújtatlan kontroll). A lízist tPA-GFP hozzáadásával indítottuk, a lízisfront haladását konfokális lézermikroszkóp segítségével monitoroztuk. Zöld csatorna: tPA-GFP, piros csatorna: fibrin, mindkét panel harmadik oszlopa: kombinált kép. Lépték = 50 μ m. Az ábra felső részén feltüntettük a tPA-GFP hozzáadását követően eltelt időt.

NET komponensek hatása a fibrinszerkezetre és a lízisre

Ex vivo trombusok

Sebészileg eltávolított artériás trombusok immunhisztokémiai és SEM analízise változó mértékű, széles körű DNS-festődést mutatott (5. ábra). A hisztonok szintén jellemző komponensnek bizonyultak, és egyes esetekben fibrin-aggregátumokkal kolokalizálnak mutatkoztak. Ezen megfigyelésekre alapozva DNS- és hiszontartalmú alvadékokban, mint modell trombusokban tanulmányoztuk a NET komponensek alvadékszerkezetre és lízisre kifejtett hatásait.



5. ábra. Artériás trombusok fibrin, hiszton és DNS tartalma. A SEM alapján vörösvértestben (TO) illetve fibrinben (GI) gazdag trombusokkal szemben a leukocytákban gazdag (TJ) trombus masszív DNS- és hisztonfestődést mutat. Lépték: 50 µm a konfokális panelekben, 2 µm a SEM paneleken.

Szerkezeti vizsgálatok és trombin inaktiváció

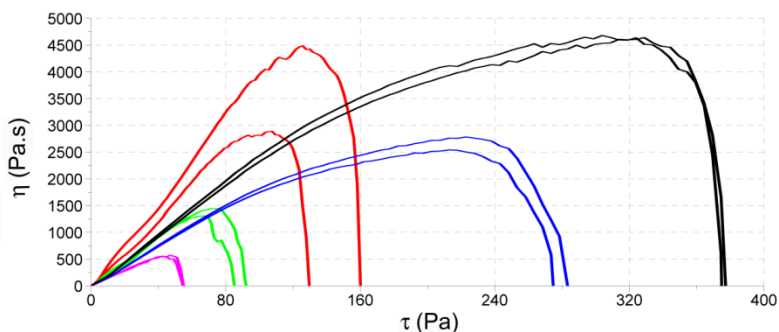
Alacsony trombin-koncentráció mellett a hisztonok jelenléte felerősítette a DNS fibrinszál-átmérőkre kifejtett hatásait, ezáltal vastagabb szálú fibrin kialakulásához vezetett. Ezzel szemben magasabb trombin-koncentráció mellett a DNS és hisztonok ellentétes hatásokkal bírtak plazma alapú rendszerben: a DNS a szálak vastagodását, míg a hisztonok a szálak vékonyabbá válását segítették elő.

Fibrinalvadékok esetében a hisztonok jelenléte mintegy 4-szeresére növelte a permeabilitási konstans, DNS jelenlététől függetlenül. A komplexebb plazma-rendszerben azonban ezzel ellentétes hatás mutatkozott: hiszton hozzáadása a K_S értékét csaknem 50%-al csökkentette. A DNS mindkét vizsgált rendszerben konzisztens negatív hatással bírt az alvadék porozítására nézve.

Mivel a trombin koncentrációja önmagában is hatással van a fibrinszerkezetre nézve, megvizsgáltuk a NET komponensek trombin antitrombin általi inaktivációjára kifejtett hatását. A hisztonok hatékonyan kivédtek az antitrombin hatását heparin jelenlétében is. Ezt a hatást fiziológiás antitrombin-koncentráció mellett növekvő koncentrációban hozzáadott DNS is csak részben volt képes ellensúlyozni.

NET komponenseket tartalmazó fibrin reológiai paraméterei

Szembevető különbségek észlelhetők a 6. ábrán, amely a fibrinalvadék széteséséhez szükséges nyírási feszültséget mutatja. DNS jelenlétében a fibrin nyírással szembeni



6. ábra. DNS- és hiszontartalmú fibrinalvadékok reometriás folyásgörbéi. Az ábráról leolvasható a fibrin széteséséhez (“elfolyósodásához”) szükséges kritikus nyírófeszültség. Piros: kontroll fibrin; zöld, magenta, kék, fekete: 50 és 100 $\mu\text{g/ml}$ DNS-t, 300 $\mu\text{g/ml}$ hiszton, 300 $\mu\text{g/ml}$ hiszton+100 $\mu\text{g/ml}$ DNS-t tartalmazó alvadékok. τ : nyírófeszültség, η : viszkozitás.

érzékenysége megnövekedett, amely a fibrin széteséséhez szükséges kritikus nyírófeszültség csökkent értékében tükröződik (az az érték, ahol a viszkozitás meredeken a 0-hoz tart). Ezzel szemben hisztonok, illetve még kifejezettebben hiszton és DNS együttes jelenléte esetén az alvadékok a nyírással szemben ellenállóbbá válnak.

NET és komponenseinek hatása plazmaalvadékok lízisére

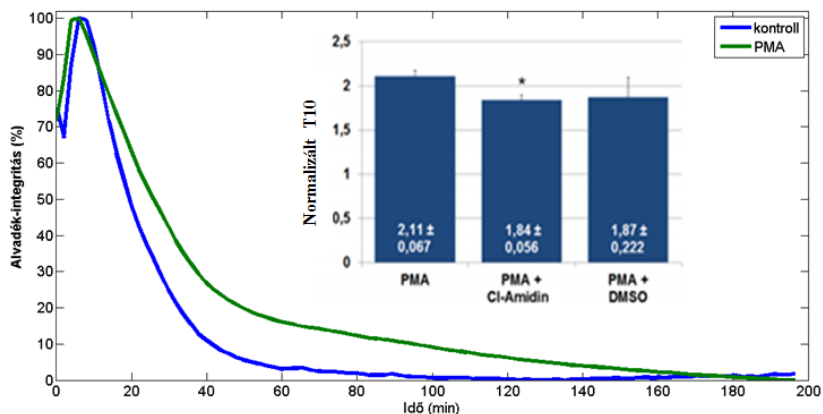
A konfokális mikroszkópos vizsgálatok során a DNS és hisztonok önmagukban elhanyagolható hatással bírtak a tPA penetrációjára vonatkozóan, együttes jelenlétük azonban mintegy 25%-al csökkentette a lízisfront 30 perc alatti haladásának mértékét.

A kromogén plazmin szubsztráttal (SPPL) végzett mérések alapján DNS jelenlétében plazminogént tartalmazó plazmaalvadék-felületen mintegy 20%-al csökkent a *p*-nitroanilin keletkezés sebessége, míg hiszton ± DNS jelenléte növelte ezen értéket.

A turbidimetriás esszében DNS és hiszton hozzáadása külön és együtt is növelte a plazmaalvadék 90%-s líziséhez szükséges időt, míg az 50%-es lízisig eltelt idő lényegében változatlan maradt. ITC vizsgálatok alapján a 150 kDa feletti FDP-k mind DNS-hez, mind hisztonhoz nagyobb affinitással kötődnek, mint fibrinogénhez, illetve plazminogénhez, ami hozzájárulhat a lízisesszékben észlelt késleltetett alvadékszéteséshez.

Forbol-mirisztin-acetát (PMA) által aktivált granulocitákból származó NET jelenléte reprodukálta az izolált komponensek hatásait (7. ábra): a T10 mintegy duplájára nőtt,

míg a T50 érték enyhén emelkedett. A NETózis inhibitor Cl-Amidin csökkentette a NET T10-re kifejtett hatását.



7. ábra. Aktivált neutrofileket tartalmazó plazmaalvadék tPA-indukált lízise. Az A_{340} turbiditási értékeket normalizálást követően alvadék-integritásként fejeztük ki. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet 8-8 párhuzamosából számolt átlaggörbéit tüntettük fel. Betét: Cl-Amidin és vehikulumának (dimetilszulfoxid, DMSO) hatása a T10 értékére. A T10 értékeket a kontrollra normalizáltuk. 3 független kísérletből származó 6-8 paraméter átlagát és azok standard deviancia értékeit tüntettük fel.

Míg a hiszton \pm DNS plazmaalvadékban nem befolyásolta szignifikánsan a plazmin-indukálta emésztés lítikus frontjának mozgását IBIDI lemezekben, DNS jelenléte önmagában mintegy 40%-al csökkentette a frontmozgás sebességét, ami összhangban állt a DNS defibrinogénált plazma által indukált plazmin-inaktivációt elősegítő hatásával.

KÖVETKEZTETÉSEK

(1) A fibrin megnyúlása szerkezeti változásokkal jár (vékonyabb szálátmérők, kisebb pórusok). Ezen paraméterek eloszlása homogénebb, mint nyújtatlan kontroll esetében.

(2) A szerkezeti változások a lítikus érzékenység csökkenésével párosulnak: a tPA- és a plazmin-indukálta fibrinolízis egyaránt gátolt a nyújtott szubsztráton.

(3) A NETek fő tömegét alkotó DNS és hisztonok jelen vannak az artériás trombusokban.

(4) Alacsony trombin-koncentráció mellett létrejövő alvadékok esetén DNS és hiszton jelenléte vastagabb szálak megjelenését eredményezi. A DNS önmagában csökkenti az alvadék porozitását, míg a hisztonok hatása tiszta- illetve plazma rendszerekben eltérő (pozitív, illetve negatív hatás).

(5) A hisztonok gátolják a trombin antitrombin általi inaktivációját heparin jelenlététől függetlenül. DNS jelenléte részben kivédi ezt a hatást.

(6) DNS önmagában csökkenti az alvadékok mechanikai stabilitását, míg hiszton \pm DNS növeli a fibrin nyírással szembeni ellenállását.

(7) A DNS-t és hisztont, vagy aktivált neutrofilekből származó NETet tartalmazó alvadékok ellenállóbbak a tPA-indukálta lízissel szemben, a DNS jelenléte önmagában pedig gátolja a plazmin-indukálta alvadékemésztést.

(8) Mind a DNS, mind a hisztonok interakcióba lépnek fibrin degradációs termékekkel. Ezen kölcsönhatások hozzájárulhatnak az alvadék késleltetett széteséséhez.

Jelentőség:

(1) Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az érpályában megnövekedett nyíróerőnek kitett (pl. bifurkációban fekvő) trombusok terápiás feloldása nehezített lehet. Eredményeink kiegészítik azt a korábbi megfigyelést, miszerint az alvadék-retrakció folyamata (vérlemezkék összehúzódása, következményes fibrinmegnyúlás és víz expulzió) a lízissel szemben ellenállóbb trombusok létrejöttéhez vezet.

(2) A trombusokban jelen lévő DNS-hisztin mátrix lebontása (pl. DNázok, vagy hisztint hasító proteázok mint pl. aktivált protein C alkalmazásával) javíthatja a jelenlegi, elsősorban a fibrinváz feloldását célzó trombolitikus protokollok hatékonyságát.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

[1] **Varjú I**, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedjiev K, Silva MM, Longstaff C, Kolev K. (2011) Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. *J Thromb Haemost*, 9(5):979-86. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04203.x.

Impakt faktor: 5.731

[2] Longstaff C, **Varjú I**, Sótonyi P, Szabó L, Krumrey M, Hoell A, Bóta A, Varga Z, Komorowicz E, Kolev K. (2013) Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*, 288(10):6946-56. doi: 10.1074/jbc.M112.404301.

Impakt faktor: 4.600

[3] **Varjú I**, Kolev K. Fibrinolysis at the Interface of Thrombosis and Inflammation — The Role of Neutrophil Extracellular Traps. In: Kolev K (szerk.), *Fibrinolysis and Thrombolysis*. InTech, Rijeka, 2014: pp. 31-59. doi: 10.5772/57259.

Impakt faktor: -