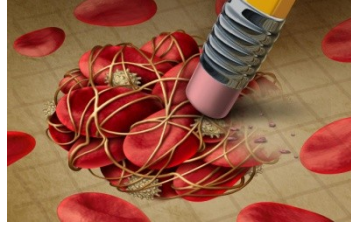




ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

"Οι υποδοχείς PAR (Protease Activated Receptors) και ο παθοφυσιολογικός τους ρόλος στη θρόμβωση"

υπό

ΕΥΜΟΡΦΙΑ ΑΘ. ΣΧΟΙΝΑ

Ιατρός Βιοπαθολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Θρόμβωση και Αντιθρομβωτική Αγωγή»

Λάρισα, 2021

Επιβλέπων:

Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής *Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Α. Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, Ιωάννινα
2. Κ. Καλαντζή, Καρδιολόγος, Ιωάννινα
3. Ε. Λευκού, Αιματολόγος, Θεσσαλονίκη

Αναπληρωματικό μέλος:

4. Ν. Ρούσσας, Αγγειοχειρουργός, Λάρισα

**“Protease Activated Receptors (PAR) and their pathophysiologic role
in thrombosis”**

Στη μνήμη του πατέρα μου Αθ.Αθ.Σχοινά,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας συγγραφικά την εργασία μου και, συγχρόνως, ένα ταξίδι γνώσεων στο πεδίο της θρόμβωσης και της αντιθρομβωτικής αγωγής, με διάρκεια ανάλογη του αντίστοιχου μεταπτυχιακού προγράμματος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω εκ βάθρων τον κο Μιλτιάδη Ματσάγκα, Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας για την συμμετοχή μου στο πρόγραμμα και την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο Αλέξανδρο Τσελέπη, Καθηγητή Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων κι επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας για την ουσιαστική καθοδήγηση και την ευγενή κριτική του στάση. Ευχαριστώ το λοιπό, διδακτικό και μη, προσωπικό για την αδιάλειπτη συνδρομή τους στην ολοκλήρωση της παραπάνω πορείας. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξή τους όλο το προηγούμενο διάστημα.

Βόλος, Ιούνιος 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το 1991 οι Vu et al. δημοσίευσαν την ανακάλυψη ενός νέου μηχανισμού σηματοδότησης κατά τον οποίον η θρομβίνη διασπά την αμινοτελική προέκταση του υποδοχέα της, για να δημιουργήσει τελικά ένα νέο αμινοτελικό άκρο που λειτουργεί ως συνδέτης προκειμένου να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα. Πρόκειται ουσιαστικά για την ανακάλυψη των ενεργοποιούμενων από πρωτεάση υποδοχέων, των PAR (protease activated receptors).

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μία αφηγηματική ανασκόπηση της πρόσφατης βιβλιογραφίας σε σχέση με τους συγκεκριμένους υποδοχείς, δίδοντας ιδιαίτερη έμφαση στον παθοφυσιολογικό ρόλο που διαδραματίζουν οι παραπάνω υποδοχείς στη διαδικασία της θρόμβωσης.

Αποτελέσματα: Από τη μεγάλη ποικιλία των αλληλεπιδράσεων των συγκεκριμένων υποδοχέων, οι οποίες έχουν ήδη ερευνηθεί και τους πολλαπλούς ρόλους που αυτοί διαδραματίζουν σε μία σειρά από φυσιολογικές αλλά και παθολογικές διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού, γίνεται φανερό ότι η στόχευση στις δράσεις τους αποτελεί μία ιδιαίτερα υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική. Ειδικά στον τομέα της χρήσης των ανταγωνιστών των υποδοχέων PAR στη θρόμβωση η επιστημονική έρευνα έχει προχωρήσει πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα πεδία, με ήδη την ευρεία κλινική χρήση ενός φαρμακευτικού παράγοντα (Vorapaxar) και αρκετά προχωρημένες κλινικές μελέτες, φάσης II, για άλλον ένα (PZ-128). Σημαντικό πεδίο αποτελεί η εξέταση εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως, για παράδειγμα, η χρήση συνδυασμών της Vorapaxar με ήδη υπάρχουσες αντιαιμοπεταλιακές φαρμακευτικές ουσίες ή ακόμη και τη μονοθεραπεία με αυτή, έτσι ώστε να ελαττωθούν ακόμα περισσότερο οι ανεπιθύμητες αιμορραγικές επιπλοκές.

Συμπέρασμα: Δύο είναι οι βασικοί στόχοι της τρέχουσας επιστημονικής έρευνας στον τομέα της θρόμβωσης σε σχέση με τους υποδοχείς PARs: 1) η ταυτοποίηση παραγόντων με νέους μηχανισμούς δράσης – όπως για παράδειγμα είναι οι Perducins και Parmodulins και 2) η ταυτοποίηση νέων, περισσότερο εξειδικευμένων ενδείξεων σε σχέση με τους PAR-1 ανταγωνιστές.

Λέξεις – κλειδιά: Υποδοχείς ενεργοποιούμενοι από πρωτεάσες, PAR, Θρόμβωση

ABSTRACT

In 1991 Vu et al. published the discovery of a new signalling mechanism, in which thrombin cleaves the N-terminal extension of its receptor in order to form eventually a new N-terminal, which acts as a ligand to activate the receptor. This was the discovery of the protease – activated receptors (PARs).

The present dissertation is a narrative literature review regarding PAR receptors, with particular emphasis on the pathophysiological role of those receptors in the process of thrombosis.

Results: From the wide variety of interactions of the PARs that have already been investigated and the multiple roles they have in a number of normal and pathological processes of the human body, it has become clear that targeting their actions is a very promising therapeutic strategy. Especially in the field of the use of the PARs – antagonists in thrombosis, scientific research has advanced much further than the other fields with the already widespread wide clinical use of one drug (vorapaxar), and the advanced phase II clinical studies for another one (PZ-128). An important area is also the consideration of alternative therapeutic approaches, such as the use of combinations of vorapaxar with already existing antiplatelet drugs, or even its use as monotherapy, in order to further reduce the unwanted bleeding complications.

Conclusion: There are two main objectives of the current scientific research in the field of thrombosis in relation to PARs: 1) the identification of agents with new mechanisms of action, such as Pepducins and Parmodulins, and 2) the identification of novel, even more specialized, indications of the PAR-1 antagonists.

Key – words: Protease – activated receptors, PARs, thrombosis.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	6
Κατάλογος εικόνων.....	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Οι υποδοχείς PAR (protease-activated receptors).....	11
1.2 Η βιολογική δράση των υποδοχέων PAR.....	13
1.3 Ο ρόλος των υποδοχέων PAR στη θρομβίωση.....	18
1.3.1 Οι κυτταρικές αντιδράσεις στη θρομβίνη.....	19
1.4 Η ενεργοποίηση των υποδοχέων PAR από τη θρομβίνη.....	21
1.5 Οι σχετιζόμενοι με τους υποδοχείς PAR θεραπευτικοί στόχοι.....	22
1.6 Προοπτικές για το μέλλον.....	23
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	25
Κεφάλαιο 2. Μεθοδολογία.....	25
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα.....	27
3.1 Η atoraxar.....	27
3.2 Η voraxar.....	30
3.3 Τα νεώτερα δεδομένα – Οι νεώτεροι θεραπευτικοί στόχοι.....	34
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η απάντηση του οργανισμού στην αγγειακή βλάβη.....	9
Εικόνα 2: Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχέων PAR.....	12
Εικόνα 3: Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων PAR με μία σειρά από άλλους υποδοχείς.....	14
Εικόνα 4: Η δράση των υποδοχέων PAR όπως αυτή έχει διαπιστωθεί από την ανάλυση της έκφρασής τους και από ερευνητικά δεδομένα.....	17
Εικόνα 5: Η δράση της θρομβίνης επί των αιμοφόρων αγγείων.....	20
Εικόνα 6: Ο χημικός τύπος της atoraxar.....	28
Εικόνα 7: Ο μηχανισμός δράσης της voraparaxar.....	31
Εικόνα 8: Η προτεινόμενη δομή του ανθρώπινου υποδοχέα PAR-4, με τα διαφορετικά τμήματά του και τις λειτουργίες τους.....	35
Εικόνα 9: Ο τρόπος δράσης της πεπδουκίνης PZ-128.....	37

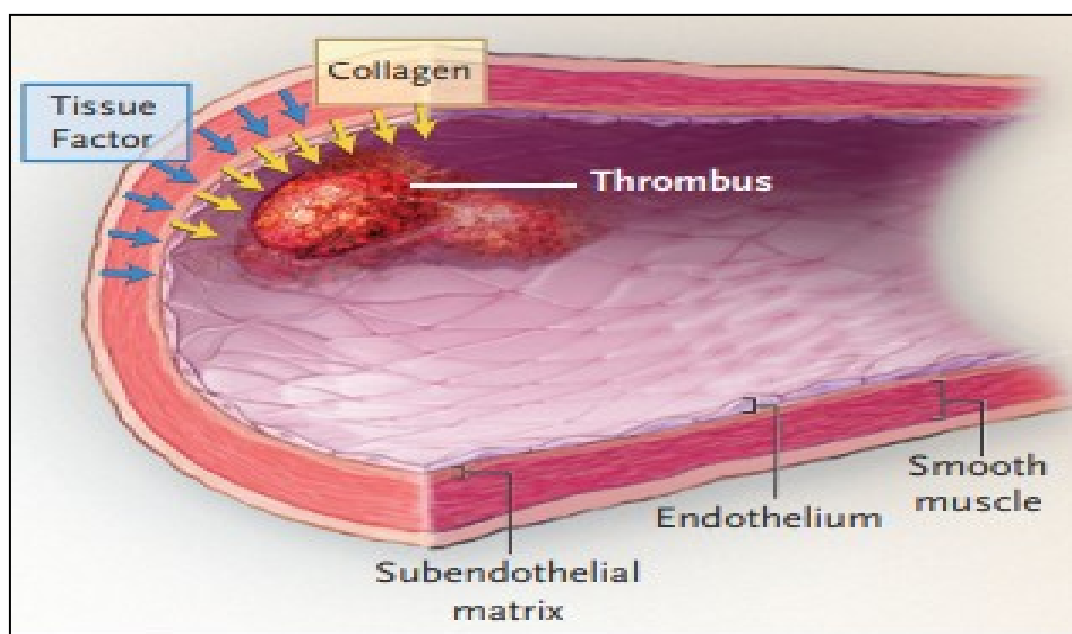
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα η διεθνής επιστημονική κοινότητα γνώριζε ότι μια σειρά από πρωτεάσες, όπως για παράδειγμα είναι η θρυψίνη και η θρομβίνη, είχαν την ικανότητα να ασκούν στα κύτταρα δράσεις οι οποίες ομοιάζαν με αυτές των ορμονών. Στις συγκεκριμένες δράσεις περιλαμβάνεται η μιτογένεση (δηλαδή η επαγωγή ή η έναρξη της μίτωσης των κυττάρων) καθώς και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οι οποίες ρυθμιζόταν από την πρωτεολυτική ενζυμική δραστηριότητα. Για καιρό η αναζήτηση των υποδοχέων της θρομβίνης δεν είχε καταλήξει σε ουσιαστικά αποτελέσματα, καθώς οι ερευνητές δεν μπορούσαν να αποδείξουν τη δέσμευση του ενζύμου αυτού με την κατάλληλη συγγένεια στα συγκεκριμένα κύτταρα. Η απάντηση στα συγκεκριμένα ερωτήματα άρχισε να δίδεται το 1991, με την ανακάλυψη και περιγραφή του πρώτου από τους υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις πρωτεάσες, έναν υποδοχέα της θρομβίνης, ο οποίος σήμερα είναι γνωστός ως PAR-1 (protease-activated receptor-1) ^[1]. Πιο συγκεκριμένα, οι Vu et al., δημοσίευσαν τον Μάρτιο του 1991 στο *Cell* την ανακάλυψη ενός νέου μηχανισμού σηματοδότησης, κατά τον οποίον η θρομβίνη διασπά την αμινοτελική προέκταση του υποδοχέα της για να δημιουργήσει τελικά ένα νέο αμινοτελικό άκρο, το οποίο λειτουργεί ως συνδέτης προκειμένου να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα.

Ως θρόμβωση χαρακτηρίζεται εκείνη η παθολογική κατάσταση, κατά την οποία σχηματίζονται αιματικοί θρόμβοι εντός των αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα να παραβλάπτεται η ομαλή κυκλοφορία του αίματος εντός του κυκλοφορικού

συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού. Στην περίπτωση κατά την οποία ένα αγγείο του σώματος (είτε πρόκειται για αρτηρία, είτε για φλέβα), υφίσταται κάποιον τραυματισμό, τότε τα θρομβοκύτταρα (αιμοπετάλια) του αίματος σε συνδυασμό με το ινώδες σχηματίζουν τον θρόμβο προκειμένου να περιορίσουν την αιματική απώλεια. Ακόμα όμως και στην περίπτωση, κατά την οποία δεν υπάρχει κάποιος σαφής τραυματισμός αγγείου, είναι δυνατόν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να σχηματιστούν εντός αυτού θρόμβοι. Ένας θρόμβος ή ένα τμήμα του το οποίο απελευθερώνεται και κυκλοφορεί εντός του συστήματος των αγγείων του σώματος αποτελεί το έμβολο ^[2]. Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζεται σχηματικά η αντίδραση του οργανισμού στην περίπτωση του τραυματισμού ενός αγγείου



Εικόνα 1: Η απάντηση του οργανισμού στην αγγειακή βλάβη

Το κολλαγόνο (collagen) καθώς και ο ιστικός παράγοντας (tissue factor –TF ή F III), παρέχουν τον αιμοστατικό φραγμό για την διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του υψηλής πίεσης κυκλοφορικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού. Το κολλαγόνο (κίτρινα βέλη) το οποίο βρίσκεται υποενδοθηλιακά υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το κυκλοφορούν αίμα. Ο ιστικός παράγοντας (μπλε βέλη), στην μέση στιβάδα (στιβάδα λείων μυών) καθώς και στην επιφανειακή στιβάδα του αιμοφόρου αγγείου έρχεται σε άμεση επαφή με το αίμα μετά από κάποιον τραυματισμό του αγγείου. Τόσο το κολλαγόνο όσο και ο ιστικός παράγοντας ξεκινούν την διαδικασία του σχηματισμού του θρόμβου, με το κολλαγόνο να αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και τον ιστικό παράγοντα την δεύτερη ^[2].

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες λειτουργίας των αγγείων, υπάρχει μία ισορροπία ανάμεσα στην θρομβογένεση και την θρομβοδιάλυση, δηλαδή ανάμεσα στην κατάσταση εμφάνισης επικίνδυνων αιμορραγιών και στην εμφάνιση των θρομβώσεων.

Τα έως τώρα χρησιμοποιούμενα στην κλινική πράξη αντιθρομβωτικά φάρμακα χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ¹³¹ :

- 1) Τα αντιαμοπεταλιακά, των οποίων η δράση συνίσταται στην παρεμπόδιση της συσσώρευσης (συγκόλλησης) των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία του αρχικού (μαλακού) αιμοπεταλιακού θρόμβου και,
- 2) Τα αντιπηκτικά, τα οποία με διάφορους μηχανισμούς αναστέλλουν, είτε άμεσα, είτε έμμεσα του παράγοντες της πήξεως του αίματος, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού του πλέγματος του ινώδους και του τελικού στέρεου θρόμβου.

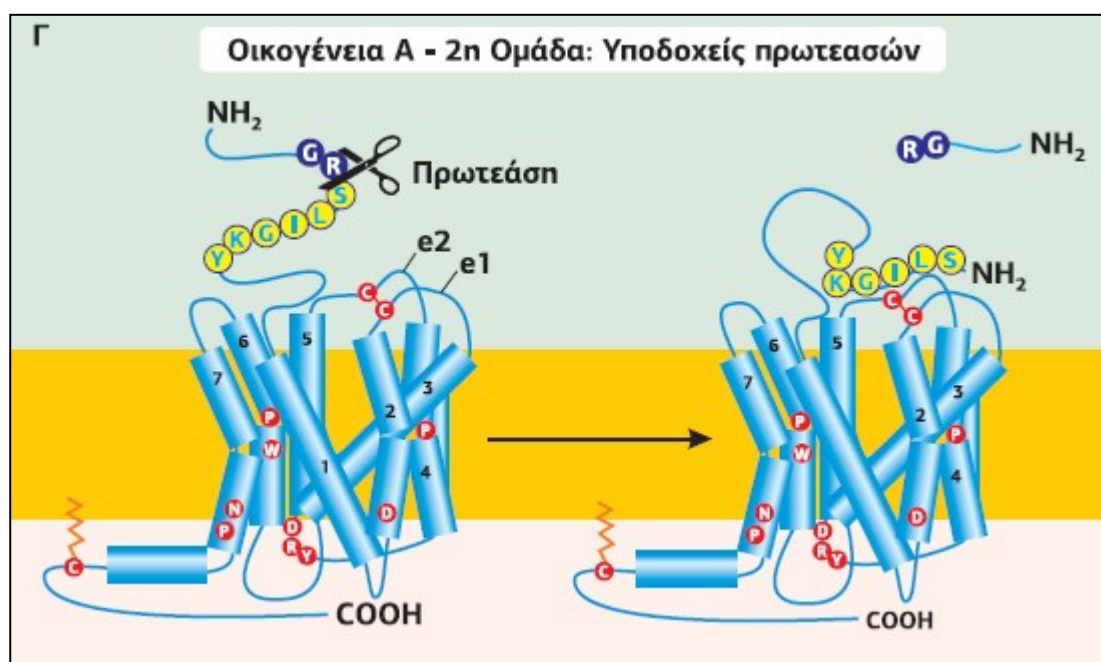
Παρά όμως τις τρέχουσες αντιθρομβωτικές θεραπείες, η αιμορραγία παραμένει σημαντική πηγή ανησυχίας, περιορίζοντας σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα της φαρμακευτικής παρέμβασης στην αποτελεσματική θεραπεία ασθενών με θρόμβωση ή με κίνδυνο εμφάνισής της. Οι πρόσφατοι πρόοδοι στην κατανόηση της συμβολής της παραγωγής θρομβίνης στην αρτηριακή θρόμβωση και του ρόλου των αιμοπεταλίων στην φλεβική θρόμβωση ανοίγουν τα δρόμο σε καινοτόμα θεραπευτικά μονοπάτια, με τους υποδοχείς PAR να αποτελούν κομμάτι της σχετικής έρευνας ¹³¹.

Με την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση θα παρουσιαστούν τα δεδομένα της πρόσφατης βιβλιογραφίας σε σχέση με τον παθολοφυσιολογικό ρόλο που διαδραματίζουν οι υποδοχείς PAR στην διαδικασία της θρόμβωσης.

1.1 Οι υποδοχείς PAR (protease-activated receptors)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι Vu et al., (1991) ¹⁴¹ περιέγραψαν τον πρώτο από τους υποδοχείς οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις πρωτεάσες, έναν υποδοχέα της θρομβίνης ο οποίος σήμερα είναι γνωστός ως PAR-1 (protease-activated receptor-1). Η ανακάλυψη του υποδοχέα PAR-1 αποδείχθηκε πολύ σημαντική καθώς σύντομα

διαπιστώθηκε ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας αλλά και τα υπόλοιπα μέλη της ομάδος αυτής των υποδοχέων, που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors – GPCRs, Οικογένεια A, 2^η Ομάδα) και χαρακτηρίζονται από παρουσία επτά διαμεμβρανικών α-ελίκων (7TM) εμφανίζουν έναν διαφορετικό μηχανισμό ενεργοποίησής τους από τους υπόλοιπους υποδοχείς. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεάσες, στοχεύοντας σε μία απολύτως εξειδικευμένη θέση, αποκόπτουν το τελικό τμήμα του εξωκυτταρικού αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα, με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο τμήμα να απομακρύνεται από τον υποδοχέα και να εμφανίζεται ένα νέο αμινοτελικό άκρο. Πρόκειται για το τελικό άκρο το οποίο θα δράσει ως προσδέτης συνδεόμενος εντός του μορίου με τους εξωκυττάριους βρόχους του (e2), ενεργοποιώντας τον υποδοχέα^[4], **Εικόνα 2**.



Εικόνα 2: Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχέων PAR

Ένα τμήμα της εξωκυτταρικής NH₂-τελικής περιοχής αποκόπτεται από τις πρωτεάσες με αποτέλεσμα να εμφανιστεί ένα νέο NH₂-τελικό άκρο το οποίο θα συνδεθεί εντός του μορίου με τον e2 εξωκυττάριο βρόχο, ενεργοποιώντας με τον τρόπο αυτόν τον υποδοχέα. Πηγή: https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/BIO_U_143/PDF%20%CE%92%CE%B9%CE%B2%CE%BB%CE%AF%CE%BF%CF%85%20%CE%94%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CF%85%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%95%CF%80%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CE%B9%CE%BD%CF%89%CE%BD%CE%AF%CE%B1%20-%20%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B3%CF%89%CE%B3%CE%AE%20%CE%A3%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82/kefalai05-2019.pdf.

Από την παραπάνω περιγραφή γίνεται αντιληπτό ότι ο ρόλος της πρωτεάσης είναι να τροποποιήσει τη δομή του υποδοχέα κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η πρωτεάση να αποτελέσει τον ίδιο τον ενεργοποιητή του. Κατά πάσα πιθανότητα, η αποτυχία των προγενέστερων ερευνητών να ανιχνεύσουν την ισχυρή κυτταρική πρόσδεση της θρομβίνης οφείλεται στο γεγονός ότι απαιτείται μόνο η παροδική δέσμευση του ενζύμου στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενεργοποίησή του ¹⁵.

Το αμέσως επόμενο χρονικό διάστημα, με την μέθοδο της ομόλογης κλωνοποίησης ταυτοποιήθηκαν ακόμα τέσσερις υποδοχείς PAR: αρχικά ανακαλύφθηκε ο PAR-2, ως υποδοχέας της θρομβίνης και, στη συνέχεια, μετά από την διαπίστωση ότι κύτταρα ποντικών στα οποία δεν εκφραζόταν ο PAR-1 υποδοχέας (PAR-1 null mice), εξακολουθούσαν να αντιδρούν στη θρομβίνη, ανακαλύφθηκαν δύο ακόμα υποδοχείς της θρομβίνης, οι PAR-3 και PAR-4 ¹⁶. Στην συνέχεια, η επιστημονική έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο αποκάλυψε ότι, αν και αρχικά οι υποδοχείς PAR εντοπίστηκαν στα αιμοπετάλια, στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η παρουσία τους ήταν εξίσου διαδεδομένη και στο νευρικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στα αστρογλοία και στα νευρικά κύτταρα.

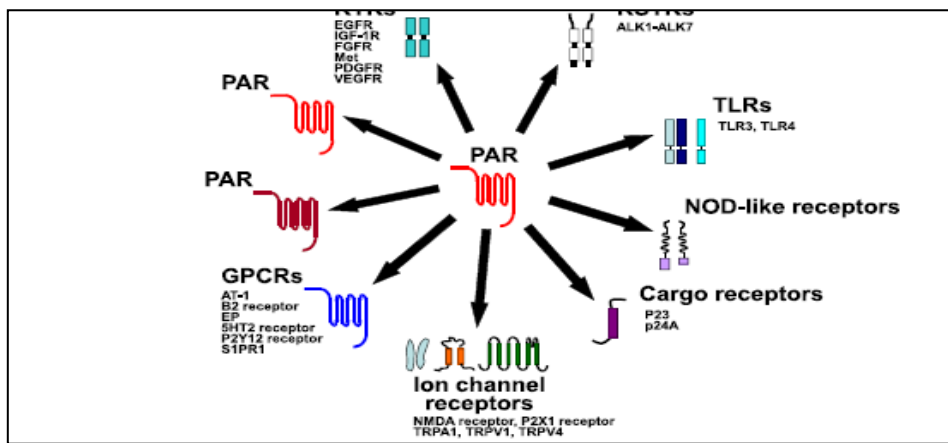
Παρά το γεγονός ότι όλα τα μέλη της οικογένειας των PAR μοιράζονται τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών GPCRs, συμπεριλαμβανομένου και του κεντρικού πυρήνα αποτελούμενου από επτά διαμεμβρανικές έλικες (TM1 έως TMVII), οι οποίες μεταξύ τους συνδέονται με τρεις ενδοκυττάριους (il1, il2, il3) και τρεις εξωκυττάριους βρόχους (el1, el2, el3), εντούτοις χαρακτηρίζονται από έναν μοναδικό μηχανισμό πρωτεολυτικής ενεργοποίησης: ενώ οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες GPCRs ενεργοποιούνται αναστρέψιμα από μικρά υδρόφιλα μόρια προκειμένου να εκκινήσει η πρόκληση των κυτταρικών αποκρίσεων, η ενεργοποίηση των υποδοχέων PAR από ενδογενείς πρωτεάσες περιλαμβάνει την αποκάλυψη ενός N-τελικού συνδέτη ("tethered ligand – TL), ο οποίος παραμένει προσκολλημένος στον υποδοχέα χωρίς μπορεί να διαχυθεί ¹⁷.

1.2 Η βιολογική δράση των υποδοχέων PAR

Έως σήμερα, η σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων PAR έχει διαπιστωθεί ότι ενεργοποιεί μία σειρά από διαδρομές ^[4] :

- 1) Πρόκειται για την «κλασσική οδό», κατά την οποία η ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί την σηματοδότηση διαμέσου ετερο-τριμερών G-πρωτεϊνών προς περιφερικούς στόχους,
- 2) Πρόκειται για το μονοπάτι της β-αρρεστίνης και τέλος,
- 3) Την ενεργοποίηση μιας ποικιλίας άλλων υποδοχέων και παραγόντων σηματοδότησης, στους οποίους περιλαμβάνονται οι προσταγλανδίνες, οι ενδοκυττάριας κινάσες καθώς και οι υποδοχείς TLR (toll-like receptors).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι διάφοροι μηχανισμοί ενεργοποίησης στους οποίους συμμετέχουν οι υποδοχείς PARS περιλαμβάνουν όχι μόνο υποδοχείς αυξητικών παραγόντων ή υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G, αλλά, επιπλέον, και μία μεγάλη σειρά σηματοδοτών, **Εικόνα 3**. Δεδομένης λοιπόν της πολυπλοκότητας των δικτύων της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, η ικανότητα των υποδοχέων PAR να παράγουν ένα συγκεκριμένο – κατευθυνόμενο σήμα προσθέτει ένα ακόμα επίπεδο ευελιξίας στους τρόπους με τους οποίους η ενεργοποίησή τους μπορεί να ρυθμίσει τη συμπεριφορά των κυττάρων και των ιστών ^[8].



Εικόνα 3: Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων PAR με μία σειρά από άλλους υποδοχείς

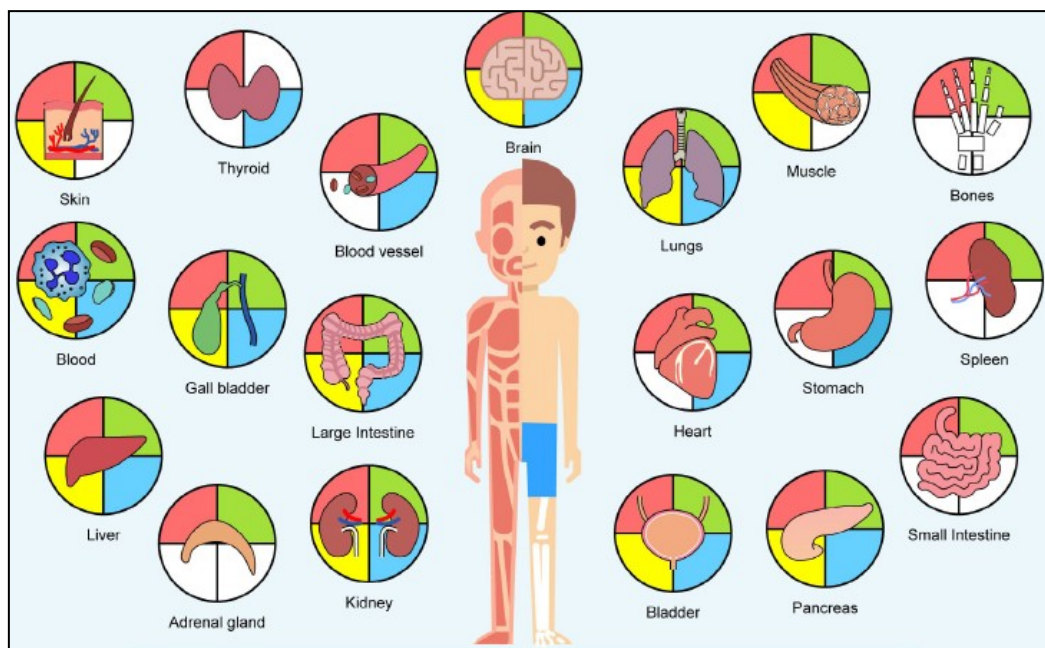
Επιπλέον, οι υποδοχείς PAR έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν ομομερείς αλληλεπιδράσεις (ανοιχτό κόκκινο – ανοιχτό κόκκινο σύμβολο) ή ετερομερείς αλληλεπιδράσεις (ανοιχτό κόκκινο – σκούρο κόκκινο σύμβολο) με άλλους υποδοχείς PAR ^[4].

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις των υποδοχέων PAR, αυτοί μεσολαβούν σε μία διευρυμένη σειρά κυτταρικών αποκρίσεων σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, οι κυριότερες από τις οποίες είναι οι εξής:

- *Υποδοχείς θρομβίνης:* Η θρομβίνη παράγεται από την προθρομβίνη στο αίμα και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της πήξης. Στα πλαίσια του συγκεκριμένου μηχανισμού, οι υποδοχείς PAR μεσολαβούν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της επαγωγής της θρομβίνης, με τα ανθρώπινα αιμοπετάλια να εκφράζουν με υψηλή συγγένεια τον υποδοχέα PAR-1 και με αρκετά χαμηλότερη τον υποδοχέα PAR-4. Εκτός όμως από την συγκεκριμένη δράση, οι υποδοχείς της θρομβίνης εκφράζονται και σε εξωαγγειακά κύτταρα σε μία σειρά ιστών όπως για παράδειγμα είναι ο εγκέφαλος και οι σκελετικοί μύες. Στην περίπτωση των κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος έχει διαπιστωθεί ότι οι δράσεις των υποδοχέων PAR-1 περιλαμβάνουν την ανάκλιση (retraction) των νευριτών και τον πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων (Galindo et al., 2018). Όσον αφορά το μυοσκελετικό σύστημα, ο επαγόμενος από τους PAR-1 υποδοχείς πολλαπλασιασμός των μυοβλαστών κατά πάσα πιθανότητα συμβάλει στην ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος του νεογνού. Τέλος, στα οστά, οι υποδοχείς PAR-1 επάγουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών μέσω της μετατροπής του αυξητικού παράγοντα-β, με αποτέλεσμα να αποτελούν ισχυρό διεγερτικό παράγοντα της οστεογένεσης¹⁹¹.
- *Η δράση του υποδοχέα PAR-2:* Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πρώτο ένζυμο το οποίο αποδείχθηκε ότι ενεργοποιούσε τον υποδοχέα PAR-2 ήταν η θρυψίνη, ένα ένζυμο με σημαντική παρουσία στο γαστρεντερικό σύστημα. Έχει λοιπόν διαπιστωθεί ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων PAR-2 έχει ως αποτέλεσμα τη σύσπαση των λείων μυών του στομάχου και τη ταυτόχρονη απελευθέρωση προσταγλανδινών από το επιθήλιου του λεπτού εντέρου, κάτι που αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο του υποδοχέα αυτού στην κινητικότητα αλλά και τη αντιφλεγμονώδη προστασία του γαστρεντερικού συστήματος¹¹⁰¹. Στο αγγειακό σύστημα, οι υποδοχείς PAR-2 μεσολαβούν στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων, με την ενεργοποίηση του PAR-2 να οδηγεί σε αγγειοδιαστολή καθώς και σε ελάττωση της αρτηριακής

πίεσης σε πειραματόζωα – ποντίκια. Επιπλέον, οι αποκρίσεις μίας σειράς ιστών αποδεικνύουν ότι οι υποδοχείς PAR-2 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μία σειρά από φλεγμονώδεις διαδικασίες, όπως για παράδειγμα στην διαστολή των αεροφόρων οδών μέσω της παραγωγής προσταγλανδινών και την ύφεση της συμπτωματολογίας της φλεγμονής των αεροφόρων οδών ^[11].

Είναι φανερό, από τα προαναφερόμενα, ότι οι βιολογικές δράσεις των υποδοχέων PAR στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολλές και ποικίλες, ασκούμενες σε πολλούς ιστούς και συστήματα οργάνων. Η έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα είναι συνεχής, με ολοένα και περισσότερα ευρήματα. Σαν παράδειγμα, ο PRR-4, εκτός από τη δράση που έχει στον ηλιακτικό μηχανισμό αλλά και σε προ-φλεγμονώδεις διαδικασίες, φαίνεται ότι εμπλέκεται και στις οδούς του πόνου, με μηχανισμούς ανεξάρτητους από αυτούς της φλεγμονής έχοντας σημαντική κλινική δράση ενάντια στην αλλοδυνία και την υπεραλγησία ^[12]. Χαρακτηριστική, λοιπόν της πολυποίκιλης δράσης των υποδοχέων PAR είναι η **Εικόνα 4** στην οποία παρουσιάζεται σχηματικά ο μεγάλος αριθμός των οργάνων του ανθρώπινου σώματος που επιδρούν ^[13].



Εικόνα 4: Η δράση των υποδοχέων PAR όπως αυτή έχει διαπιστωθεί από την ανάλυση της έκφρασής τους και από ερευνητικά δεδομένα

PAR-1: κόκκινο, PAR-2: πράσινο, PAR-3: κίτρινο, PAR-4: μπλε, Ουδεμία γνωστή έκφραση: λευκό ^[13].

1.3 Ο ρόλος των υποδοχέων PAR στην θρόμβωση

Ο «καταρράκτης της πήξης» (“coagulation cascade”) και οι υποδοχείς PAR σε συνδυασμό μεταξύ τους δημιουργούν έναν ιδιαίτερα εξελιγμένο μηχανισμό που συνδέει την ιστική βλάβη με την αντίδραση του οργανισμού σε κυτταρικό επίπεδο. Όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει πλέον αποδειχθεί ότι οι συγκεκριμένοι υποδοχείς σε μεγάλο βαθμό είναι υπεύθυνοι για τις κυτταρικές επιδράσεις της θρομβίνης, ενώ ταυτόχρονα έχουν την ικανότητα να μεσολαβούν στην σηματοδότηση μιας σειράς άλλων, προσομοιαζόντων με τη θρυψίνη, πρωτεασών ^[14].

Η θρομβίνη αποτελεί τη βασική πρωτεάση, η οποία εμπλέκεται στον καταρράκτη της πήξεως του αίματος, με μία σειρά από πολύπλοκες ενζυματικές αντιδράσεις να πραγματοποιούνται μετά από τον αγγειακό τραυματισμό και καθώς οι κυκλοφορούντες στο αίμα παράγοντες της πήξης έρχονται σε επαφή με τον ιστικό παράγοντα. Ο ιστικός παράγοντας, ο οποίος αποτελεί μία τύπου – I ενσωματωμένη στην κυτταρική μεμβράνη πρωτεΐνη, είναι ένας απαραίτητος συν-παράγοντας για την ενεργοποίηση του παράγοντα X από τον παράγοντα VIIa. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας Xa, με τη βοήθεια ενός άλλου, σχετιζόμενου με την επιφάνεια του κυττάρου, συμ-παράγοντα, του παράγοντα Va, είναι αυτός ο οποίος στη συνέχεια θα μετατρέψει την προθρομβίνη στην ενεργό θρομβίνη. Η εντόπιση και ο περιορισμός του καταρράκτη της πήξης στην επιφάνεια των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της παραγωγής της θρομβίνης, η οποία έχει βραχύ χρόνο ζωής εντός της κυκλοφορίας του αίματος, και στο πλαίσιο της δράσης της σε φυσιολογικό αγγειακό ενδοθήλιο ενεργοποιεί το σύστημα της πρωτεΐνης C (APC, ένα φυσικό αντιπηκτικό), προκειμένου να τερματίσει τη διαδικασία της παραγωγής της. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με τα παραπάνω, η θρομβίνη θεωρείται ότι ασκεί την δράση της κοντά στην περιοχή της παραγωγής της και η τοπική παραγωγή της θρομβίνης στην κυτταρική επιφάνεια μπορεί να ευνοήσει την αλληλεπίδρασή της με τους παρακείμενους υποδοχείς PAR ^[15].

Ένα επίσης, ιδιαίτερα σημαντικό μόριο για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της θρομβίνης είναι η αντιθρομβίνη III, μία γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος η οποία παράγεται στο ήπαρ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου και λειτουργεί ως ένας

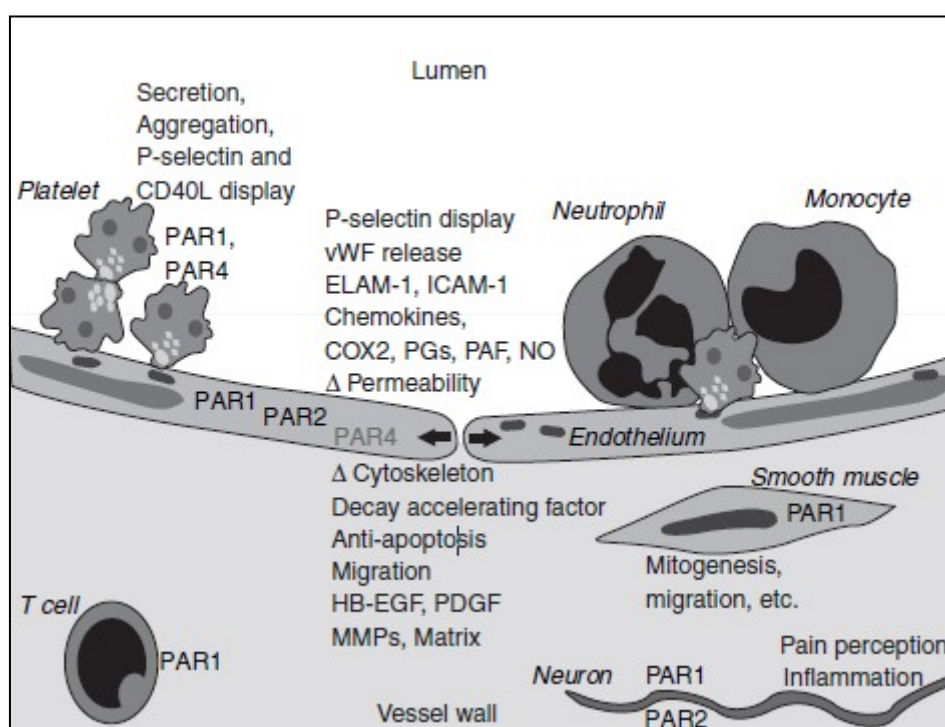
ισχυρός αναστολέας της πήξης του αίματος, αδρανοποιώντας τη θρομβίνη αλλά και μία σειρά από άλλες πρωτεάσες της σερίνης, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων IXa, Xa, XIa και XIIa ¹⁶. Μάλιστα, θεωρείται ότι η αντιθρομβίνη III είναι υπεύθυνη για το 80% περίπου της ανασταλτικής της θρομβίνης ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος.

1.3.1 Οι κυτταρικές αντιδράσεις στη θρομβίνη

Η θρομβίνη έχει μία σειρά από άμεσες δράσεις σε κυτταρικό επίπεδο, αποτελώντας, ίσως, τον πιο αποτελεσματικό, *ex vivo* (εκτός δηλαδή του περιβάλλοντος του οργανισμού) ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι προκαλεί μεταβολές στο σχήμα των αιμοπεταλίων και προάγει τη σύνθεση και απελευθέρωση της θρομβοξάνης A₂, την κινητοποίηση της P-σελεκτίνης, τη σύνδεση του CD40 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση της Ιντεγκρίνης αIIbβ₃ (GPIIb/IIIa), με την τελευταία να είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του Ινωδογόνου καθώς και του παράγοντα Von Willebrand, για τη μεσολάβηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ¹⁷. Όπως αναφέρθηκε, η θρομβίνη προκαλεί την έκφραση της προπηκτικής της δραστηριότητας στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την περαιτέρω παραγωγή θρομβίνης. Σε πειραματικά μοντέλα καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων, η θρομβίνη προκαλεί την απελευθέρωση του παράγοντα Von Willebrand και την εμφάνιση της P-σελεκτίνης στην κυτταρική μεμβράνη καθώς και την παραγωγή μίας σειρά από χυμοκίνες – δράσεις οι οποίες όλες έχουν αποδειχθεί ότι τελικά προκαλούν «*in vivo*» τη δέσμευση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η θρομβίνη επιπλέον, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη διάμετρο των αιμοφόρων αγγείων μέσω της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής ενώ, επί απουσίας ενδοθηλίου, δρα στα λεία μυϊκά κύτταρα, προκαλώντας αγγειοσυστολή. Σε καλλιέργειες ινοβλαστών και λείων μυϊκών κυττάρων αγγείων έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την παραγωγή κυτοκινών, έχοντας ταυτόχρονα και μιτογόνο δράση, ενώ παράλληλα, πυροδοτεί τη σηματοδότηση του ασβεστίου καθώς και άλλων κυτταρικών αποκρίσεων στα T-λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω, είναι εμφανής ο ρόλος της στις διάφορες κυτταρικές διεργασίες που συνδέονται τόσο

με την αιμόσταση, όσο και με την φλεγμονή, καθιστώντας κρίσιμη την έρευνα στους υποδοχείς που μεσολαβούν στη σηματοδότησή της, όπως είναι οι υποδοχείς PAR¹⁴¹. Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζεται σχηματικά η δράση της θρομβίνης επί των αιμοφόρων αγγείων.



Εικόνα 5: Η δράση της θρομβίνης επί των αιμοφόρων αγγείων

Η θρομβίνη είναι μία πολλαπλών λειτουργιών πρωτεάση σερίνης η οποία παράγεται στο σημείο της αγγειακής βλάβης, αποτελώντας αναμφισβήτητα τον πιο αποτελεσματικό παράγοντα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ταυτόχρονα, προκαλεί μία σειρά από αποκρίσεις του αγγειακού επιθηλίου, στις οποίες περιλαμβάνονται οι μεταβολές του σχήματος και της διαπερατότητάς του, η κινητοποίηση συγκολλητικών μορίων στην επιφάνειά του καθώς και η διέγερση παραγωγής κυτοκινών. Είναι τέλος μιτογόνος για τα μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα προάγει της αντιδράσεις των T-λευκοκυττάρων. Όλες αυτές οι δράσεις φανερώνουν τον κυρίαρχο ρόλο που διαδραματίζει στις φλεγμονώδεις και αιμοστατικές αντιδράσεις μετά από την κάθε ιστική βλάβη¹⁴¹.

1.4 Η ενεργοποίηση των υποδοχέων PAR από τη θρομβίνη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι PARs είναι υποδοχείς συζευγμένοι με την πρωτεΐνη G, οι οποίοι μεσολαβούν στην εμφάνιση των κυτταρικών επιδράσεων μιας σειράς πρωτεασών, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνεται και η θρομβίνη. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται με την πρωτεολυτική αποκοπή (cleavage) του τελικού τμήματος του εξωκυτταρικού NH₂-τελικού άκρου με αποτέλεσμα να αποκαλύπτεται το νέο NH₂-τελικό άκρο, το οποίο επιδρώντας ως προσδέτης, θα ενεργοποιήσει τον υποδοχέα ^{14]}, **Εικόνα 1**.

Ο υποδοχέας PAR-1 (στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο F2R, χρωμόσωμα 17) ^{18]} είναι ο πρώτος από τους υποδοχείς της συγκεκριμένης οικογένειας (Οικογένεια A – 2^η Ομάδα των υποδοχέων πρωτεασών) που ανακαλύφθηκε, σε αυτή την προσπάθεια ακριβώς να ανακαλυφθούν υποδοχείς οι οποίοι θα μπορούσαν να μεσολαβήσουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και άλλων κυττάρων του πλάσματος από τη θρομβίνη. Έως τώρα έχουν βρεθεί τέσσερις υποδοχείς PAR οι οποίοι εκφράζονται με διαφορετικό μεταξύ τους τρόπο στα κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων (ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αιμοφόρων αγγείων), στα αιμοπετάλια αλλά και σε άλλα κυκλοφορούντα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού ^{19]}.

Από τους υποδοχείς PAR, οι PAR-1 και PAR-4 (στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο F2RL3, χρωμόσωμα 19) ενεργοποιούνται από τη θρομβίνη, πιθανώς σε συνδυασμό με άλλες πρωτεάσες, στις οποίες περιλαμβάνονται η πλασμίνη και η αγγειοστατίνη ^{20]}. Επιπλέον, η θρομβίνη ενεργοποιεί και τον υποδοχέα PAR-3 ο οποίος δρα ως συν-παράγοντας του PAR-4, χωρίς όμως ο PAR-3 (στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο F2RL2, χρωμόσωμα 17) να φαίνεται ότι προκαλεί άμεσα κάποια ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Παρά το γεγονός ότι ο PAR-2 (στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο F2RL1, χρωμόσωμα 17) δεν ενεργοποιείται άμεσα από την θρομβίνη, εντούτοις έχει αναφερθεί ότι μπορεί να μετενεργοποιηθεί από τον αποκομμένο από τη θρομβίνη παράγοντα PAR-1 ^{21]}. Τέλος, φαίνεται ότι οι PAR-1 και PAR-2 έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιηθούν από την πρωτεΐνη C (APC), χωρίς όμως να είναι ακόμα ξεκάθαρος ο λειτουργικός της ρόλος.

Η θρομβίνη και οι υποδοχείς PAR διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της παθογένεσης της αρτηριακής θρόμβωσης, η οποία αποτελεί το κύριο αίτιο των απώτερων επιπλοκών της αθηροσκλήρωσης στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, στην περιφερική αρτηριακή νόσο καθώς και στο ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Στις φυσιολογικές αρτηρίες οι υποδοχείς PAR εκφράζονται κατά κύριο λόγο στα ενδοθηλιακά κύτταρά τους, με μικτή μόνο συμμετοχή στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών. Οι ενδοθηλιακοί PARs συμμετέχουν στην ρύθμιση του αγγειακού τόνου, της αγγειακής διαπερατότητας καθώς και της εκκριτικής δραστηριότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών μεσολαβούν την αγγειοσύσπαση, μετανάστευση, υπερτροφία και παραγωγή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Σύμφωνα με τους Flaumenhaft and De Ceunynck, (2017) ^[22], οι PARs έχουν σημαντική συμβολή στον προ-φλεγμονώδη φαινότυπο ο οποίος παρατηρείται κατά την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου κάτι που σημαίνει ότι η υπερ-δραστηριότητά τους, ειδικά στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αιμοφόρων αγγείων έχει κομβικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης και της επαναστένωσης των αγγείων.

1.5 Οι σχετιζόμενοι με τους υποδοχείς PAR θεραπευτικοί στόχοι

Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω, ήδη από τα τέλη της πρώτης δεκαετίας του 2000, οι υποδοχείς PAR έγιναν αντικείμενο εξαντλητικής επιστημονικής έρευνας λόγω του κρίσιμου ρόλου που έχουν σε σηματοδοτήσεις μέσω της επίδρασης της θρομβίνης στην αιμόσταση, την φλεγμονή, τα κακοήθη νεοπλάσματα, ακόμα και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ειδικά στο πεδίο της θρόμβωσης οι υποδοχείς PAR αποτελούν σημαντικό θεραπευτικό στόχο προκειμένου να ανασταλεί η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και επομένως η θρόμβωση. Έπειτα από αρκετά χρόνια εργαστηριακών και κλινικών μελετών, το 2014 έλαβε άδεια κυκλοφορίας στις ΗΠΑ ο πρώτος ανταγωνιστής του υποδοχέα PAR-1, η voraparaxar (Zontivity, παρασκευή από την φαρμακευτική εταιρεία Merck), ως συμπληρωματική θεραπευτική αγωγή στην αντιμετώπιση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων ^[23].

Το Voraparaxar χορηγείται από το στόμα, αναστέλλει την ενεργοποίηση από την θρομβίνη των αιμοπεταλίων, χωρίς ταυτόχρονα να επηρεάζει τον καταρράκτη της

πήξης του αίματος, απορροφάται πολύ γρήγορα ενώ ταυτόχρονα έχει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, προσφέροντας με τον τρόπο αυτό στον ασθενή υψηλή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Μεταβολίζεται διά του κυτοχρώματος CYP3A4 στο ήπαρ, ενώ απεκκρίνεται κυρίως με τα κόπρανα και πολύ λιγότερο από τους νεφρούς. Παρόλα αυτά, η κλινική χρήση της νογαραχαρ στο αμέσως επόμενο χρονικό διάστημα ήταν περιορισμένη, καθώς καταγράφηκαν αρκετές και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, ειδικά με την μορφή μείζονων αιμορραγικών επεισοδίων και αυξημένου κινδύνου ενδοκράνιας αιμορραγίας σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα (Cunningham et al., 2016) ^[24]. Οι δύο μεγαλύτερες κλινικές μελέτες φάσης III οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του σκευάσματος (μελέτη TRACER, με συμμετοχή 12.944 ασθενών από 37 διαφορετικές χώρες και μελέτη TRA 2^o P-TIMI, με συμμετοχή 29.449 ασθενών από 38 χώρες έδειξαν ότι ^[25]: 1) οι ασθενείς οι οποίοι έχουν ήδη υποστεί έμφραγμα μυοκαρδίου έχουν σημαντικό όφελος από την προσθήκη της νογαραχαρ στην συνήθη χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή, αλλά 2) οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά περισσότερα αιμορραγικά συμβάντα. Έτσι, λοιπόν, η κλινική ένδειξη η οποία τελικά δόθηκε για τον συγκεκριμένο αναστολέα του PAR-1, είναι το ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου ή ισχαιμίας των κάτω άκρων, αποκλείοντας ασθενείς με ιστορικό οξέος εγκεφαλικού επεισοδίου ή παροδικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Είχε ήδη προηγηθεί η παρασκευή ενός ακόμα ισχυρού εκλεκτικού αντιστρεπτού ανταγωνιστή του υποδοχέα PAR-1, της Atoraxar, της οποίας όμως η αποτελεσματικότητα δεν ήταν ικανοποιητική, ενώ παράλληλα κρίθηκε ως μη ασφαλής, καθώς παρατηρήθηκε σε σημαντικό αριθμό ασθενών που το έλαβαν παράταση του διαστήματος QTc στο ηλεκτροκαρδιογράφημα καθώς και σημαντική αύξηση του επιπέδου των ηπατικών ενζύμων. Όλα τα παραπάνω είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή του προγράμματος ανάπτυξης του φαρμάκου ^[26].

1.6 Προοπτικές για το μέλλον

Οι τέσσερις υποδοχείς οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις πρωτεάσες (PARs), έχει πλέον διαπιστωθεί ότι μεσολαβούν έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών απαντήσεων

έναντι διαφόρων εξωκυττάρων πρωτεασών. Ειδικά ο ρόλος του PAR-1 στην διαδικασία της θρόμβωσης έχει μελετηθεί με πολλές λεπτομέρειες. Η αρχική πρόκληση για την ανάπτυξη ανταγωνιστών του PAR-1 ήταν ο εντοπισμός μορίων τα οποία συνδέονται ισχυρά στην θέση δέσμευσης, έτσι ώστε να ανταγωνιστούν τον ήδη προσδεδεμένο συνδέτη. Η πρόκληση αυτή έχει ήδη απαντηθεί, με την παρασκευή και έγκριση κυκλοφορίας της Voraparaxar, του πρώτου αναταγωνιστή PAR-1. Η νέα πρόκληση πλέον, είναι η δημιουργία νέων ανταγωνιστών PAR-1 με ανάλογη ή και βελτιωμένη αποτελεσματικότητα με αυτήν της Voraparaxar, αλλά με ελαχιστοποίηση των αιμορραγικών ανεπιθύμητων ενεργειών. Για να επιτευχθεί ο συγκεκριμένος σκοπός δύο είναι οι πιο πιθανές αποτελεσματικές στρατηγικές ^[22]: 1) η ταυτοποίηση παραγόντων με νέους μηχανισμούς δράσης – όπως για παράδειγμα είναι οι perducins και parmodulins, οι οποίες είναι πεπτίδια που έχουν την ικανότητα να διεισδύουν εντός του κυττάρου, δρώντας ως ενδοκυττάριοι ρυθμιστές της μεταφοράς των σημάτων από τους υποδοχείς PAR στις G πρωτεΐνες ^[27] και 2) η ταυτοποίηση νέων, ακόμα περισσότερο εξειδικευμένων ενδείξεων σε σχέση με τους PAR-1 ανταγωνιστές. Οι ενδείξεις αυτές θα πρέπει να συμβαδίζουν σε μεγάλο βαθμό με τα ειδικά χαρακτηριστικά του φαρμακευτικού παράγοντα, όπως για παράδειγμα οι φαρμακοκινητικές – φαρμακοδυναμικές του ιδιότητες, η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα, η αναστρεψιμότητα της δράσης και η πιθανή τοξικότητά του. Τέλος, κατά πάσα πιθανότητα, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον μελέτες στις οποίες να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια εναλλακτικών – συνδυαστικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα είναι η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με Voraparaxar και Ασπιρίνη ή Τικαγρερόλη ή Θεινοπυριδίνη ^[25].

Στο Ειδικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας που ακολουθεί, θα παρουσιαστούν τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία σχετίζονται με το ρόλο που έχει έως τώρα αποδειχθεί ότι έχουν οι υποδοχείς PAR στην κλινική πράξη όσον αφορά τη θρόμβωση, καθώς και τα νεώτερα δεδομένα σε σχέση με τους θεραπευτικούς τους στόχους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2. Μεθοδολογία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση των πρόσφατων δεδομένων της βιβλιογραφίας σε σχέση με τον ρόλο που έχουν οι υποδοχείς PAR στην διαδικασία της θρόμβωσης στον ανθρώπινο οργανισμό, τα φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία χρησιμοποιούνται έως σήμερα αλλά και τους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους οι οποίοι έχουν τεθεί για το άμεσο μέλλον.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο συγκεκριμένος στόχος επελέγει το εργαλείο της αφηγηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας (narrative literature review), το οποίο, ενώ σε μεγάλο ποσοστό ακολουθεί τις αρχές της συστηματικής βιβλιογραφικής ανασκόπησης (systematic literature review), εντούτοις χαρακτηρίζεται από την λιγότερο αυστηρή μέθοδο παρουσίασης των αποτελεσμάτων που έχουν εξαχθεί, ενώ βέβαια δεν πραγματοποιείται στατιστική ανάλυση των ευρημάτων, όπως γίνεται κατά την μετα-ανάλυση ^[28].

Οι βάσεις επιστημονικών δεδομένων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των σχετικών δημοσιευμένων άρθρων ήταν οι: *PubMed/NCBI*, *Google Scholar* και *Cochrane Library of Systematic Reviews*. Οι λέξεις κλειδιά (mesh terms), οι οποίες τέθηκαν στις αντίστοιχες μηχανές αναζήτησης ήταν οι: *Protease activated receptors*, *PARs*, *Thrombosis*, *Therapeutic targets*, σε διάφορους μεταξύ τους συνδυασμούς και με την χρήση των διαζευκτικών όρων AND και OR.

Τα κριτήρια εισόδου για την επιλογή των δημοσιευμένων άρθρων ήταν τα ακόλουθα:

- Τυχαιοποιημένες και μη-τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες με ομάδα ελέγχου,
- Έτος δημοσίευσης μετά το 2010,
- Γλώσσα δημοσίευσης η αγγλική,
- Δημοσιευμένα άρθρα των οποίων ήταν διαθέσιμα το πλήρες κείμενό τους.

Από την άλλη πλευρά αποκλείστηκαν οι βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις, οι μελέτες σειράς, οι παρουσιάσεις περιστατικών καθώς και οι πειραματικές – *in vivo* μελέτες.

Αμέσως μετά ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφικής ανασκόπησης.

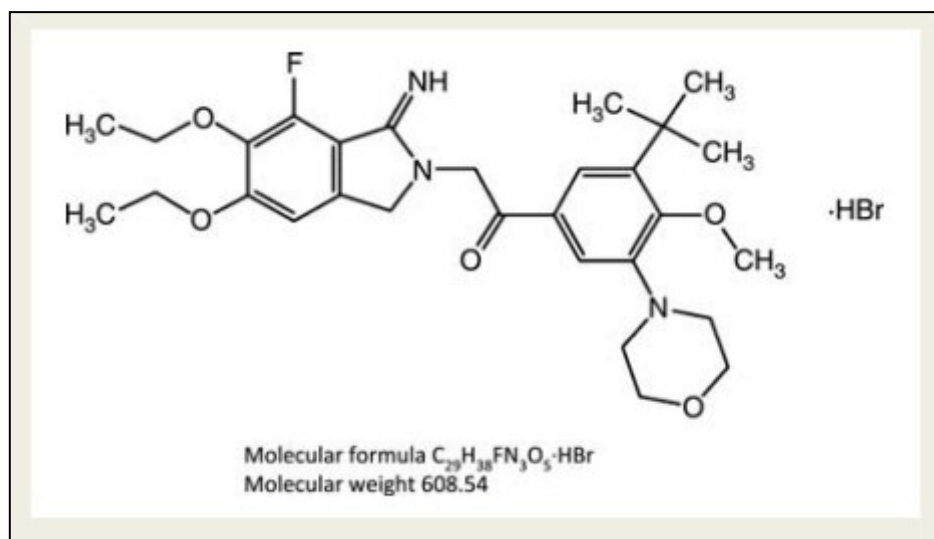
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αντίθετα από τους μηχανισμούς της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων του αίματος με ADP και τη θρομβοξάνη TxA_2 , η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η οποία πραγματοποιείται μέσω του υποδοχέα PAR-1, έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία πλούσιου σε αιμοπετάλια αποφρακτικού θρόμβου, ο οποίος, αφενός οδηγεί σε παθολογική εξέλιξη της διαδικασίας της θρόμβωσης, αφετέρου η όλη διαδικασία δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της αιμόστασης. Επιπλέον, ήδη από τα τέλη της προηγούμενης δεκαετίας, είχε διαπιστωθεί ότι για την ομαλή διαδικασία της αιμόστασης, πολύ σημαντικότερο ρόλο παίζει η ενεργοποίηση από την θρομβίνη του Ινωδογόνου προς Ινώδες, και όχι η ενεργοποίηση, μέσω του υποδοχέος PAR-1, των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη ^[29]. Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν την επιστημονική έρευνα στην προσπάθεια ανάπτυξης και εφαρμογής στην κλινική πράξη αναστολέων του υποδοχέα PAR-1 της θρομβίνης, προκειμένου να ενισχυθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα της αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς με νόσους του καρδιαγγειακού συστήματος. Αποτέλεσμα της προσπάθειας αυτής ήταν η παρασκευή και αξιολόγηση στην κλινική πράξη δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων, της Atoraxar (E-5555) και της Voraparaxar (SCH 530348) ^[25].

3.1 Η Atoraxar

Η Atoraxar αποτελεί έναν ιδιαίτερα ισχυρό, από του στόματος χορηγούμενο, εκλεκτικό ανταγωνιστή του υποδοχέα PAR-1, της οποίας η δράση ασκείται μέσω της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το πεπτίδιο TRAP (thrombin-receptor

activating peptide – πεπτίδιο-ενεργοποιητής του υποδοχέα της θρομβίνης). Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται ο χημικός τύπος του μορίου της Atoraxar ^[30].



Εικόνα 6: Ο χημικός τύπος της atoraxar

$C_{29}H_{38}FN_3O_5 \cdot HBr$, μοριακό βάρος 608.54 ^[30].

Το 2010 οι Goto et al., ^[30], δημοσίευσαν τα αποτελέσματα δύο, φάσης II, πολυκεντρικών, τυχαιοποιημένων μελετών με ομάδα ελέγχου, προκειμένου να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της χορήγησης Atoraxar σε συνδυασμό με τη συνηθισμένη θεραπευτική αγωγή σε Ιάπωνες ασθενείς πάσχοντες από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και από υψηλού κινδύνου στεφανιαία νόσο. Συμμετείχαν συνολικά 504 ασθενείς, με αυτούς της ομάδος ελέγχου να λαμβάνουν, μαζί με τη συνηθισμένη θεραπευτική τους αγωγή, Atoraxar, σε δοσολογία 50mg, 100mg ή 200mg, μία φορά την ημέρα per os, για χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων (ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο) και 24 εβδομάδες (ασθενείς πάσχοντες από υψηλού κινδύνου στεφανιαία νόσο). Από την άλλη πλευρά, οι ασθενείς της ομάδος ελέγχου ελάμβαναν με τη συνηθισμένη τους αγωγή, εικονικό φάρμακο (placebo).

Το βασικό καταληκτικό κριτήριο έκβασης ήταν η εμφάνιση αιμορραγικών επεισοδίων, τα οποία χαρακτηρίστηκαν σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση CURE (Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events) ^[31], σε μείζονα και

ελάσσονα επεισόδια, καθώς και σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction) ¹³², σε μείζονα, ελάσσονα και ελάχιστα. Το δευτερεύον καταληκτικό κριτήριο της μελέτης ήταν η εμφάνιση μείζονος παρενέργειας από το καρδιαγγειακό σύστημα (στην οποία περιλαμβάνεται ο θάνατος από καρδιαγγειακό συμβάν, έμφραγμα μυοκαρδίου, οξύ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή υποτροπή του οξέος ισχαιμικού επεισοδίου). Τα βασικά αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι:

- Δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες σε σχέση με το αιμορραγικά επεισόδια τα οποία έχρηζαν ιατρικής αντιμετώπισης,
- Υπήρχε μία αριθμητική διαφορά, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική, στην αύξηση των αιμορραγικών επεισοδίων κατά TIMI στους ασθενείς της ομάδος παρέμβασης οι οποίοι έλαβαν την δόση των 200mg.
- Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνιση μείζονων συμβάντων από το καρδιαγγειακό σύστημα στις δύο ομάδες της μελέτης και τέλος,
- Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική και δοσοεξαρτώμενη εμφάνιση ανωμαλιών στην ηπατική λειτουργία καθώς και ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες στο διάστημα QTcF στους ασθενείς της ομάδος παρέμβασης.

Το τελικό συμπέρασμα των συγγραφέων ήταν ότι η Atoraxar σε όλες τις χορηγούμενες δόσεις πέτυχε πολύ ικανοποιητική αναστολή των αιμοπεταλίων αλλά 1) στις δύο μεγαλύτερες δόσεις χορήγησης (100mg και 200mg) διαπιστώθηκε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης αιμορραγικών επεισοδίων κατά TIMI, και 2) Υπήρχε εμφανής επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας αλλά και εμφάνισης ηλεκτροκαρδιογραφικών ανωμαλιών, οι οποίες ήταν δοσοεξαρτώμενες.

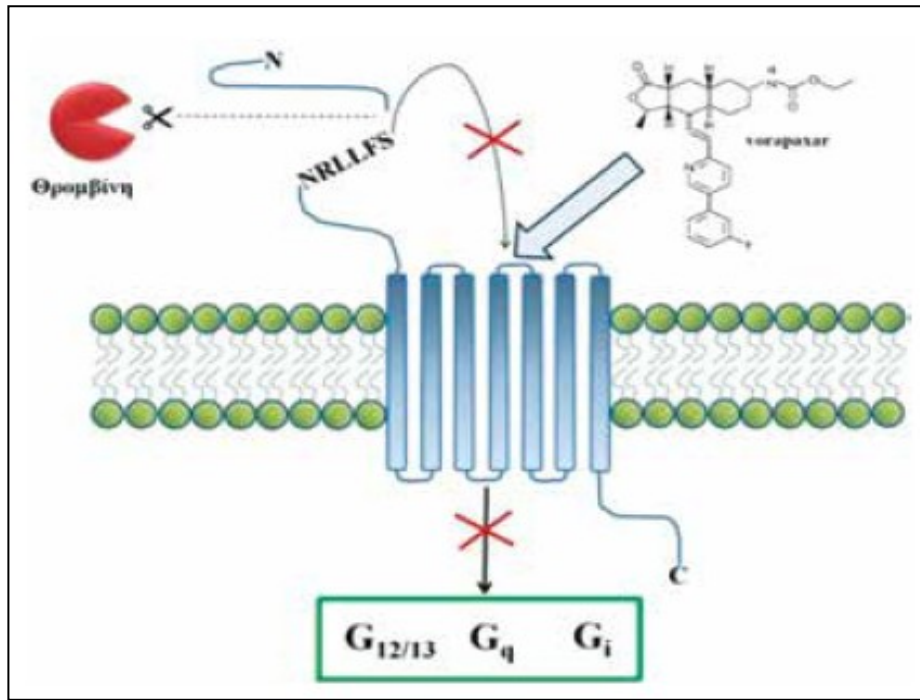
Τα παραπάνω αναφερόμενα επιβεβαιώθηκαν την επόμενη χρονιά σε μία νέα τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη με ομάδα ελέγχου ¹³³, στην οποία συμμετείχαν συνολικά 603 ασθενείς οι οποίοι πρόσφατα (μέσα στις προηγούμενες 72 ώρες) είχαν υποστεί επεισόδιο οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, χωρίς ανάσπαση του ST. Οι ασθενείς της ομάδος παρέμβασης έλαβαν μία αρχική δόση - εφόδου Atoraxar 400mg, ακολουθούμενη από ημερήσια δόση 50mg, 100mg ή 200mg, με την ομάδα ελέγχου να λαμβάνει εικονικό φάρμακο (placebo). Τα αποτελέσματα της μελέτης

έδειξαν ότι οι ασθενείς της ομάδος παρέμβασης είχαν στατιστικά σημαντική ελάττωση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου, όπως αυτή ελέγχθηκε με την 48ωρη καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφικού ρυθμού (Holter). Ταυτόχρονα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνιση ελάσσονων ή μείζονων αιμορραγικών επεισοδίων καθώς και στην εμφάνιση θανάτου από καρδιαγγειακό αίτιο, έμφραγμα μυοκαρδίου ή οξύ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Σε συμφωνία όμως, και με τη μελέτη των Goto et al. ^[30], διαπιστώθηκε παροδική, δοσοεξαρτώμενη τρανσαμινασαιμία και παράταση του διαστήματος QT στο ηλεκτροκαρδιογράφημα, στις ομάδες των ασθενών με τις υψηλότερες δόσεις του φαρμάκου.

Παρά, λοιπόν, τα αρχικά, ενθαρρυντικά, θεραπευτικά αποτελέσματα της Atoraxar, οι ανεπιθύμητες ενέργειες που προκάλεσε η χορήγησή της (τρανσαμινασαιμία και ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλοιώσεις), είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή του προγράμματος ανάπτυξής της ^[25]. Επομένως, ο μόνος θεραπευτικός παράγοντας της κατηγορίας των PARS-1 ανταγωνιστών για τον οποίον συνεχίζεται η κλινική έρευνα παραμένει η Vorapaxar.

3.2 Η Vorapaxar

Η Vorapaxar είναι μία συνθετική χημική ουσία, ανάλογη της φυσικής ουσίας himbacine, που καθώς έχει ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια με τον αναστολέα PAR-1, αποτελεί έναν ισχυρό ανταγωνιστή του. Η αντιαμοπεταλική της δράση επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού της θρομβίνης, αφήνοντας ανεπηρέαστη την παραγωγή ινώδους από το Ινωδογόνο – κάτι που τελικά σημαίνει ότι παραμένει ανεπηρέαστος ο καταρράκτης πήξης και δεν μεταβάλλεται ο χρόνος ροής-πήξης του αίματος ^[34]. Η Vorapaxar χορηγείται από το στόμα, απορροφάται ταχύτατα, έχει πολύ υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, που υπερβαίνει το 90%, παραμένει δεσμευμένη με τον υποδοχέα PAR-1 για τουλάχιστον 20 ώρες, ενώ έχει χρόνο ημίσειας ζωής 159 – 311 ώρες. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά συντελούν στην εμφάνιση ισχυρής αντιαμοπεταλικής δράσης. Ο μηχανισμός δράσης της παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα 7** ^[25].



Εικόνα 7: Ο μηχανισμός δράσης της Voraparaxar

Η δράση της Voraparaxar επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσής της στον PAR-1 υποδοχέα, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησής του από την θρομβίνη και άρα την επαγόμενη από την ενεργοποίηση αυτή μεταγωγή του σήματος ^[25].

Η βασική κλινική μελέτη φάσης III, με την οποία αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της Voraparaxar ήταν η TRA*CER ^[35]. Πρόκειται για μία πολυκεντρική, διπλή – τυφλή, τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, με ομάδα ελέγχου, σε συνολικά 12.944 ασθενείς (800 θεραπευτικά κέντρα σε 37 κράτη), που είχε ως βασικό στόχο να εξακριβωθεί εάν ο συγκεκριμένος φαρμακευτικός παράγοντας, σε συνδυασμό με τη συνήθη θεραπευτική αγωγή, είχε τη δυνατότητα να ελαττώσει τη συχνότητα εμφάνισης θανάτου από σύνθετη καρδιαγγειακή αιτία καθώς και τη συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος μυοκαρδίου, οξέος αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, υποτροπής του ισχαιμικού επεισοδίου του μυοκαρδίου με ανάγκη για επανεισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο και ανάγκη για επείγουσα στεφανιαία επαναγγείωση, σε σύγκριση με τη χρήση της συμβατικής θεραπευτικής αγωγής από μόνη της. Η Voraparaxar χορηγήθηκε στους ασθενείς της ομάδας μελέτης σε αρχική δόση φόρτισης 40mg, ακολουθούμενη από δόση συντήρησης 2.5mg άπαξ

ημερησίως, σε συνδυασμό με την τυπική αντιαιμοπεταλιακή αγωγή των ασθενών (ασπιρίνη κα / ή κλοπιδογρέλη).

Το βασικό εύρημα της μελέτης ήταν η στατιστικά σημαντική ελάττωση, στους ασθενείς της ομάδος παρέμβασης, των εμφραγμάτων μυοκαρδίου σε σύγκριση με τους ασθενείς της ομάδος μελέτης. Από την άλλη πλευρά, στην ομάδα παρέμβασης παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά περισσότερα μετρίου ή σοβαρού βαθμού αιμορραγικά επεισόδια και ειδικότερα ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες, το ποσοστό των οποίων ήταν έως και πέντε φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Η δεύτερη κλινική μελέτη, φάσης III, που αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της Voraparaxar, ήταν η μελέτη TRA 2°P-TIMI 50¹³⁶¹. Πρόκειται για μία πολυκεντρική, διπλή-τυφλή, τυχαιοποιημένη μελέτη με ομάδα ελέγχου, στην οποία συμμετείχαν συνολικά 26.449 ασθενείς σε 1.032 θεραπευτικά κέντρα 38 διαφορετικών κρατών του πλανήτη. Το βασικό καταληκτικό κριτήριο της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου ήταν η μείωση στη συχνότητα εμφάνισης θανάτου από καρδιαγγειακό επεισόδιο, στη συχνότητα εμφάνισης νέου επεισοδίου εμφράγματος μυοκαρδίου και οξέος αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Τρία χρόνια μετά από την έναρξη της μελέτης διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο παραπάνω αναφερόμενο πρωτεύον κριτήριο της μελέτης υπέρ της ομάδας της Voraparaxar (9.3% έναντι 10.5% της ομάδος ελέγχου, $p < 0.001$). Από την άλλη πλευρά, στην ομάδα της Voraparaxar διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επεισοδίων μέτριας ή σοβαρής αιμορραγίας (4.2% έναντι 2.5% στους ασθενείς της ομάδος ελέγχου, $p < 0.001$). Ταυτόχρονα, στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά της συχνότητας εμφάνισης ενδοεγκεφαλικών αιμορραγιών (1% στην ομάδα Voraparaxar έναντι 0.5% στην ομάδα ελέγχου, $p < 0.001$). Εξαιτίας του συγκεκριμένου ευρήματος, δύο χρόνια μετά από την έναρξη της μελέτης η επιτροπή παρακολούθησης της ασφάλειας και των δεδομένων της συνέστησε τη διακοπή της θεραπείας σε ασθενείς με ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου λόγω του αυξημένου κινδύνου ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας. Το τελικό συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι η αναστολή των υποδοχέων PAR-1 με τη χρήση της Voraparaxar ελαττώνει στατιστικά σημαντικά την πιθανότητα θανάτου από καρδιαγγειακά

συμβάντα όπως επίσης και τον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικών επεισοδίων σε ασθενείς με σταθερή αθηρωματική νόσο, οι οποίοι λαμβάνουν τη συνήθη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή. Εντούτοις, αυξημένος είναι ο κίνδυνος μετρίου ή σοβαρού βαθμού αιμορραγίας, συμπεριλαμβανομένης και της ενδοεγκεφαλικής.

Τα αμέσως επόμενα χρόνια η επιστημονική έρευνα σε σχέση με την αποτελεσματικότητα, αλλά ιδιαίτερα την ασφάλεια της Voraxapar συνεχίστηκε από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα. Το 2015 οι Van Diepen et al.^[37], δημοσίευσαν τα αποτελέσματα από τη συνέχιση της παρακολούθησης των ασθενών της μελέτης TRA*CER^[34], η οποία έχει ήδη παρουσιαστεί. Πιο συγκεκριμένα, παρακολούθηθηκαν, για μέσο χρονικό διάστημα 1.5 έτους, 2.207 ασθενείς οι οποίοι συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη και οι οποίοι κατά το χρονικό διάστημα αυτό υποβλήθηκαν σε μείζονα ή ελάσσονα μη-καρδιολογική χειρουργική επέμβαση. Τα βασικά κριτήρια ελέγχου της ασφάλειας ήταν η εμφάνιση κατά το χρονικό διάστημα των πρώτων 30 ημερών μετά την πραγματοποίηση της χειρουργικής επέμβασης, μετρίου ή σοβαρού αιμορραγικού επεισοδίου, σύμφωνα με την ταξινόμηση GUSTO^[38]. Από την άλλη πλευρά, το πρωτεύον κριτήριο έκβασης σε σχέση με την ισχαιμία, ήταν η εμφάνιση θανάτου από καρδιαγγειακή αιτία, εμφράγματος μυοκαρδίου, θρόμβωσης του stent ή ανάγκη επαναγγείωσης του μυοκαρδίου τις πρώτες 30 μετεγχειρητικές ημέρες.

Συνολικά συμμετείχαν 1.171 ασθενείς της ομάδας Voraxapar και 1.031 ασθενείς της ομάδας ελέγχου. Το βασικό αποτέλεσμα της μελέτης ήταν ότι δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες μελέτης όσον αφορά τα υπό μελέτη, αναφερόμενα κριτήρια έκβασης. Πρόκειται για ένα συμπέρασμα το οποίο αποδεικνύει την ασφάλεια της Voraxapar, ακόμα και στην περίπτωση κατά την οποία οι ασθενείς οι οποίοι την λαμβάνουν, υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση για λόγους μη-καρδιολογικούς.

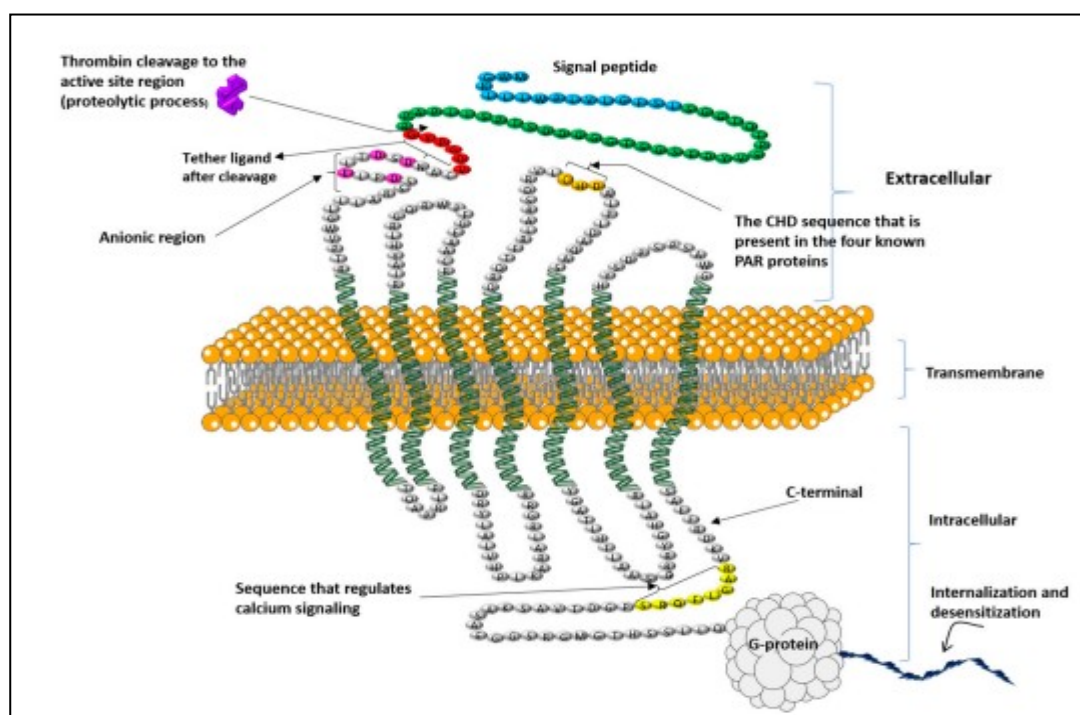
3.3 Τα νεώτερα δεδομένα – Οι νεώτεροι θεραπευτικοί στόχοι

Εκτός από τη συνέχεια στη μελέτη των ανταγωνιστών των PAR-1 υποδοχέων, με κυριότερο εκπρόσωπό τους στην κλινική πράξη τη Voraparaxar, τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα κατευθύνθηκε και στη μελέτη της δράσης που έχουν στις διαδικασίες της θρόμβωσης και οι ανταγωνιστές των PAR-4 υποδοχέων. Έχει ήδη αναφερθεί, ότι τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τόσο τους PAR-1, όσο και τους PAR-4 υποδοχείς ενώ μία σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών προάγει τη συσσώρευση και την εκκριτική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων ^[39]. Σε διάφορες πειραματικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν μία σειρά από βιολογικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να απελευθερωθούν οποιαδήποτε στιγμή μετά από την ενεργοποίησή τους. Οι Ma et al. ^[38], ήδη από το 2005 είχαν αναφέρει ότι τα αιμοπετάλια αρουραίων περιέχουν ενδοστατίνη, έναν ισχυρό αναστολέα της αγγειογένεσης, ο οποίος απελευθερώνεται ως απόκριση στον υποδοχέα PAR-4, με τρόπο ανεξάρτητο από τη διαδικασία της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μάλιστα, στην ίδια μελέτη, απέδειξαν ότι και τα αιμοπετάλια του ανθρώπινου αίματος περιέχουν ενδοστατίνη, η απελευθέρωση της οποίας μπορεί να πυροδοτηθεί μόνο μετά από την ενεργοποίηση του υποδοχέα PAR-4.

Δομικά, ο υποδοχέας PAR-4 αποτελείται από 300 αμινοξέα και είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών GPCRs. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας αποτελεί το κανάλι το οποίο χρησιμοποιείται από μία σειρά από πρωτεολυτικά ένζυμα με στόχο την έναρξη της εσωτερικής σηματοδότησης κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Αποτελείται από διάφορα μέρη τα οποία προορίζονται να επιτελέσουν διαφορετικούς ρόλους, όπως είναι για παράδειγμα μία θέση για την διάσπαση της θρομβίνης που προορίζεται για την πρωτεολυτική διάσπαση του τελικού N-άκρου του υποδοχέα, **Εικόνα 8** ^[40].

Σε σχέση λοιπόν με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, φαίνεται ότι ο υποδοχέας PAR-4 δεν συμβάλει απλώς στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αλλά ταυτόχρονα είναι

ρυθμιστής διαφόρων κυτταρικών αποκρίσεων οι οποίες σχετίζονται με τους μηχανισμούς της δημιουργίας της φλεγμονής. Αν και ήδη, στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται αρκετά αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, εντούτοις αυτά έχουν εμφανίσει διάφορες παρενέργειες οι οποίες περιορίζουν την χρήση τους. Τα δεδομένα της πρόσφατης βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η στόχευση στον υποδοχέα PAR-4 μπορεί να αποδειχθεί μία ασφαλέστερη στρατηγική για την πρόληψη της θρόμβωσης και άρα να βελτιώσει το συνολικό προφίλ ασφαλείας του καρδιαγγειακού συστήματος^{140]}.



Εικόνα 8: Η προτεινόμενη δομή του ανθρώπινου υποδοχέα PAR-4, με τα διαφορετικά τμήματά του και τις λειτουργίες τους

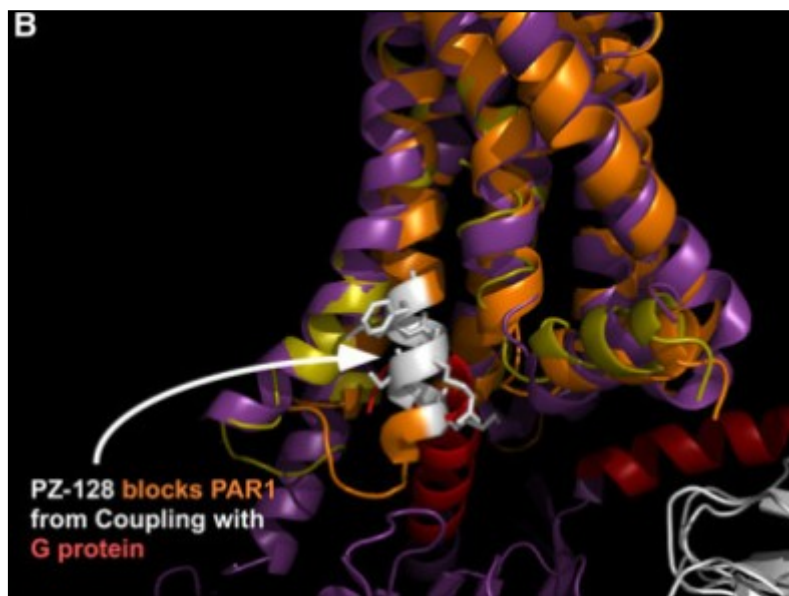
Στο άνω τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η περιοχή της διάσπασης της θρομβίνης^{141]}.

Σε μία από τις πρώτες δημοσιευθείσες σχετικές μελέτες στον ανθρώπινο οργανισμό, οι Meah et al., (2020)^{142]} διερεύνησαν την αντιθρομβωτική δράση που έχει ο συνδυασμός του ανταγωνισμού του PAR-4 υποδοχέα μαζί με την αναστολή του παράγοντα Xa. Επρόκειτο για μία φάσης Ο, διπλή-τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη, στην οποία έλαβαν μέρος 15 υγιείς εθελοντές στους οποίους καταγράφηκε η εκτός του σώματός τους (*ex vivo*) η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η συσσώρευση των

αιμοπεταλίων καθώς και ο σχηματισμός θρόμβου μετά από την έγχυση του αίματός των σε ειδικούς θαλάμους χαμηλής και υψηλής διάτμησης. Χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας PAR-4 BMS-986141 και ο αναστολέας του παράγοντα Xa apixaban (φαρμακευτικό σκεύασμα που ήδη χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι με την παρουσία αναστολέα του παράγοντα Xa, ο ανταγωνισμός του υποδοχέα PAR-4 από την φαρμακευτική ουσία BMS-986141 είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση του σχηματισμού θρόμβου, ειδικά κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης (shear stress). Πρόκειται για ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, τα οποία υποδηλώνουν την δυναμική αποτελεσματικότητα του συνδυασμού ανταγωνιστών των PAR-4 υποδοχέων με τους αναστολείς του παράγοντα Xa, οι οποίοι ήδη χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, στην προσπάθεια της πρόληψης της εμφάνισης αθηροθρομβωτικών επεισοδίων.

Καθώς οι προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας στον τομέα των ανταγωνιστών των υποδοχέων PARs συνεχιζόταν, ένας από τους καινούργιους θεραπευτικούς στόχους αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός, παραντερικά χορηγούμενου ανταγωνιστή του υποδοχέα PAR-1, έχοντας ως βασικό σκοπό την ρύθμιση της επαγόμενης από την θρομβίνη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια της διαδερμικής στεφανιαίας αγγειοπλαστικής αλλά και κατά την διάρκεια ενός οξέος στεφανιαίου επεισοδίου ¹⁴³. Η έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα λοιπόν, οδήγησε στην ανάπτυξη του παράγοντα PZ-128, μία πεπδουκίνη (perducin) – αναστολέα του υποδοχέα PAR-1, που προορίζεται για χρήση σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο μυοκαρδίου υψηλού κινδύνου καθώς και οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, οι οποίοι υποβάλλονται σε διαδερμικές επεμβάσεις των στεφανιαίων αγγείων τους.

Οι πεπδουκίνες είναι λιπιδιωμένα πεπτίδια τα οποία έχουν ως στόχο την κυτταροπλασματική επιφάνεια του συγγενούς τους υποδοχέα. Η τεχνική παρασκευής της πεπδουκίνης περιλαμβάνει την παρασκευή ενός βραχέος πεπτιδίου το οποίο προέρχεται από έναν ενδοκυττάριο βρόχο της πρωτεΐνης GPCR, συνδεδεμένο με ένα υδρόφοβο τμήμα. Η δομή αυτή επιτρέπει στην PZ-128 να «αγκυροβολήσει» στην διπλή λιπιδική στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, προκειμένου να ρυθμίσει την σύζευξη του υποδοχέα με την πρωτεΐνη G, **Εικόνα 9** ¹⁴⁴.



Εικόνα 9: Ο τρόπος δράσης της πεπδουκίνης PZ-128

Η πεπδουκίνη PZ-128 αναστέλλει τον υποδοχέα PAR-1 από την σύζευξή του με την πρωτεΐνη G¹⁴⁴.

Η PZ-128, σε πειραματικά, προ-κλινικά μοντέλα έδειξε σημαντικά αποτελεσματικότητα στην καταστολή της οξεία αρτηριακής θρόμβωσης σε πειραματόζωα – ινδικά χοιρίδια¹⁴⁵, ενώ επίσης αποδείχθηκε ότι ελαττώνει την βαρύτητα των αθηροσκληρωτικών πλακών σε πειραματόζωα – ποντίκια¹⁴⁵.

Το 2020 οι Kylioroulos et al.¹⁴⁷, δημοσίευσαν τα αποτελέσματα της πρώτης τυχαιοποιημένης, διπλής – τυφλής κλινικής μελέτης με ομάδα ελέγχου φάσης II, προκειμένου να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της PZ-128 σε ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε καρδιακό καθετηριασμό με σκοπό την πραγματοποίηση διαδερμικής στεφανιαίας παρέμβασης. Συνολικά τυχαιοποιήθηκαν 100 ασθενείς σε τρεις ομάδες μελέτης (2 ομάδες έλαβαν την PZ-128 σε δοσολογία 0.3 mg/kg και 0.5 mg/kg ενώ η τρίτη ομάδα εικονικό φάρμακο), με ενδοφλέβια οδό χορήγησης των φαρμακευτικών σκευασμάτων η οποία πραγματοποιήθηκε δύο ώρες πριν από την έναρξη του καθετηριασμού της καρδιάς, συ συνδυασμό με την συνήθως

χορηγούμενη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή. Το βασικό κριτήριο της μελέτης ήταν τα εμφανιζόμενα αιμορραγικά επεισόδια, ενώ το δευτερεύον κριτήριο είναι η εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι:

- Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τα αιμορραγικά επεισόδια (1/62, 1.6% στις ομάδες της PZ-128 και 0/35, 0% στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου),
- Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάντα ανάμεσα στις ομάδες της μελέτης στα χρονικά διαστήματα 30 και 90 ημέρες μετά από την πραγματοποίηση της παρέμβασης. Μάλιστα, αριθμητικά ήταν λιγότερες στις ομάδες της PA-128 (0% και 2% έναντι 6% και 6% για την ομάδα του εικονικού φαρμάκου, $p = 0.13$ και $p = 0.29$ αντίστοιχα).
- Για την υπο-ομάδα των ασθενών οι οποίοι είχαν ανεβασμένα επίπεδα τροπονίνης I, στο συνδυαστικό κριτήριο της εμφάνισης σοβαρής ανεπιθύμητης ενέργειας από τα στεφανιαία αγγεία καθώς και μυοκαρδιακής βλάβης, η ομάδα ελέγχου είχε ποσοστά εμφάνισης 83% έναντι 31% των ομάδων της PZ-128, προσαρμοσμένο σχετικό κίνδυνο 0.14 (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.02 – 0.75, $p = 0.02$).

Το τελικό συμπέρασμα των συγγραφέων ήταν ότι στην συγκεκριμένη πρώτη κλινική μελέτη φάσης II με ασθενείς, η χορήγηση της PZ-128 σε συνδυασμό με την συνήθη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή ήταν ασφαλής και πολύ καλά ανεκτή από τους ασθενείς, ενώ πιθανόν ελαττώνει τα ποσοστά νέκρωσης του μυοκαρδίου στο άμεσο χρονικό διάστημα μετά από την πραγματοποίηση της θεραπευτικής παρέμβασης: πρόκειται για αποτελέσματα τα οποία σαφώς και προσφέρουν την βάση για την πραγματοποίηση περαιτέρω κλινικών μελετών στο άμεσο μέλλον.

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Οι υποδοχείς PAR (protease-activated receptors), που ανακαλύφθηκαν στα τέλη του περασμένου αιώνα αποτέλεσαν και συνεχίζουν να αποτελούν αντικείμενο έντονης και συστηματικής επιστημονικής έρευνας, ειδικά στον τομέα της θεραπευτικής αντιμετώπισης των περιστατικών θρομβώσεων. Από την πρώτη δημοσίευση των Vu et al. το 1991 ^[4], έχουν περιγραφεί πλέον τέσσερις υποδοχείς PAR, των οποίων η έκφραση στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

Από τη μεγάλη ποικιλία των αλληλεπιδράσεων των συγκεκριμένων υποδοχέων και τους πολλαπλούς ρόλους που αυτοί διαδραματίζουν σε μία σειρά από φυσιολογικές αλλά και παθολογικές διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού, είναι φανερό ότι η στόχευση στις δράσεις τους αποτελεί μία ιδιαίτερα υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική. Η καλύτερη λοιπόν κατανόηση του μηχανισμών ενεργοποίησης και των σηματοδοτικών μονοπατιών, στα οποία μετέχουν θα παράσχει νέες δυνατότητες για αποκλεισμό της δράσης πιθανών αγωνιστών τους και της παθοφυσιολογίας που προκαλούν σε μία σειρά από νόσους ^[48]. Βέβαια, εκτός από τον τομέα της θρόμβωσης, όλες οι υπόλοιπες εκτιμήσεις για τις θεραπευτικές παρεμβάσεις τους βρίσκονται ακόμη σε ερευνητικό, προκλινικό στάδιο.

Έως και σήμερα, η βασική θεραπευτική αγωγή για την αντιμετώπιση της φλεβοθρόμβωσης είναι η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή – ο συνδυασμός δηλαδή της ασπιρίνης με την τικαγρερόλη ή την θειενοπυριδίνη, που όμως, σε αρκετές περιπτώσεις συνοδεύονται, είτε από υποτροπή των ισχαιμικών επεισοδίων είτε, αντίθετα, από εμφάνιση σοβαρών αιμορραγικών επεισοδίων ^[49]. Στην προσπάθεια, λοιπόν, της αντιμετώπισης των συγκεκριμένων ανεπιθύμητων ενεργειών, η σύνδεση της δράσης της θρομβίνης, ως του ισχυρότερου ανταγωνιστή των αιμοπεταλίων με τον υποδοχέα PAR-1 αρχικά, και τον υποδοχέα PAR-4 στη συνέχεια, οδήγησε την επιστημονική έρευνα στη μελέτη νέων θεραπευτικών στόχων. Από τους δύο ανταγωνιστές των PAR-1 υποδοχέων, οι οποίοι αναπτύχθηκαν και ελέγχθηκαν για την αποτελεσματικότητά και την ασφάλειά τους στην κλινική πράξη, η Atoraxar (E-

5555) δεν έλαβε τελικά αδειοδότηση, καθώς, παρά την αποτελεσματικότητα που έδειξαν οι φάσεις II μελέτες (J- LANCELOT και LANCELOT-ACS) ^[30, 33], εντούτοις υπήρχαν σημαντικές αμφιβολίες όσον αφορά την ασφάλειά της, καθώς διαπιστώθηκε ότι αφενός μεν επιβάρυνε σε σημαντικό βαθμό την ηπατική λειτουργία των ασθενών με την εμφάνιση τρανσαμινασαιμίας, αφετέρου δε προκαλούσε ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλοιώσεις (παράταση του διαστήματος QTcF).

Ο δεύτερος από τους PAR-1 αναστολείς ο οποίος ελέγχθηκε στην κλινική πράξη με μελέτες φάσεις III ήταν η Voparaxar (SCH 530348), η οποία χορηγείται *per os*, και η οποία αποδείχθηκε ότι παρέχει στατιστικά σημαντική ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης εμφράγματος μυοκαρδίου, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, θανάτου από καρδιαγγειακή αιτιολογία και ανάγκη επαναγγείωσης των στεφανιαίων αγγείων σε σταθερούς ασθενείς οι οποίοι είχαν υποστεί προηγούμενο έμφραγμα μυοκαρδίου ή έπασχαν από περιφερική αρτηριακή νόσο· με αυτές ακριβώς τις ενδείξεις η voparaxar έλαβε έγκριση κλινικής χρήσης από τον FDA τον Μάιο του 2014, έχοντας ως αντένδειξη την χρήση της σε ασθενείς με ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, λόγω αυξημένου κινδύνου σοβαρών αιμορραγικών επεισοδίων και ειδικά ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας ^[36]. Οι κλινικές μελέτες των επόμενων ετών έδειξαν την αποτελεσματικότητα αλλά ειδικά την ασφάλεια της Voparaxar στην παραπάνω αναφερόμενη ομάδα ασθενών ακόμα και στις περιπτώσεις που αυτοί υποβάλλονται σε μη-καρδιολογική, μείζονα ή ελάσσονα χειρουργική επέμβαση ^[37].

Στους βασικούς περιορισμούς της Voparaxar περιλαμβάνονται ο πολύ μεγάλος φαρμακοδυναμικός χρόνος ημίσειας ζωής, που είναι αρκετά μεγαλύτερος των 24 ωρών, καθώς και η από του στόματος χορήγησή της, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την σχετικά αργή έναρξη των δράσεών της, ειδικά για τους ασθενείς οι οποίοι θα πρέπει να υποβληθούν σε επείγουσες διαδερμικές επεμβάσεις των στεφανιαίων αγγείων, και φυσικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί τα αυξημένα ποσοστά αιμορραγικών επεισοδίων ^[49].

Έτσι λοιπόν, η επιστημονική έρευνα σε σχέση με τον ρόλο των υποδοχέων PAR στην θρόμβωση συνεχίζεται. Ένας καινούργιος, πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος είναι οι ανταγωνιστές των PAR-4 υποδοχέων, για τους οποίους υπάρχουν ενδείξεις ότι έχουν την δυνατότητα να παράσχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα

αλλά ειδικά ασφάλεια για το καρδιαγγειακό σύστημα. Βέβαια, οι σχετικές μελέτες βρίσκονται ακόμα σε πολύ πρώιμο στάδιο – φάση μελέτης 0 για τον αναστολέα PAR-4 BMS-986141)^[42].

Αντίθετα, σε αρκετά πιο προχωρημένο στάδιο βρίσκεται η επιστημονική έρευνα για την παρασκευή ενός χορηγούμενου από την παρεντερική οδό - και άρα ταχείας δράσης ανταγωνιστή PAR-1, ο οποίος θα δίνει την δυνατότητα ταχείας και γρήγορα αναστρέψιμης αναστολής των υποδοχέων PAR-1, ιδιότητες δηλαδή ιδανικές για χρήση σε ασθενείς υψηλού κινδύνου οι οποίοι υποβάλλονται σε διαδερμικές παρεμβάσεις των στεφανιαίων αγγείων τους. Πρόκειται για μία νέα ομάδα PAR-1 αναστολέων, τις πεπδοκίνες, για τον πρώτο αντιπρόσωπο των οποίων (PZ-128) έχουν ήδη πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές φάσης II^[47], με ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα, τόσο σε σχέση με την ασφάλεια, όσο και σε σχέση με την αποτελεσματικότητά της.

Οι υποδοχείς PAR, οι οποίοι αποτελέσαν αντικείμενο επιστημονικής έρευνας σχετικά πρόσφατα, φαίνεται ότι μπορεί να εκμεταλλευτούν σε μία σειρά από διαφορετικά πεδία της ιατρικής επιστήμης, όπως για παράδειγμα στην αντιμετώπιση των παθήσεων του καρδιαγγειακού συστήματος, της πνευμονικής ίνωσης, των διαφόρων μορφών αρθρίτιδας, της φλεγμονής και του πόνου, εκφυλιστικών παθήσεων του νευρικού συστήματος, ή ακόμα και για την αντιμετώπιση κακοήθων νεοπλασμάτων^[4]. Βέβαια, για σχεδόν όλες τις παραπάνω αναφερόμενες ενδείξεις, η έρευνα έχει πολύ δρόμο ακόμα καθώς βρίσκεται σε προ-κλινικό στάδιο.

Αντίθετα, στον τομέα της χρήσης των ανταγωνιστών των υποδοχέων PAR στην θρόμβωση η επιστημονική έρευνα έχει προχωρήσει πολύ περισσότερο, με ήδη την ευρεία κλινική χρήση ενός φαρμακευτικού παράγοντα (vogaraxar) και αρκετά προχωρημένες κλινικές μελέτες φάσης II για άλλον ένα. Σημαντικό πεδίο είναι, επιπλέον, η εξέταση και εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως είναι για παράδειγμα η χρήση συνδυασμών της Vogaraxar με τις ήδη υπάρχουσες αντιαιμοπεταλιακές φαρμακευτικές ουσίες, ή ακόμα και την μονοθεραπεία με αυτή, έτσι ώστε να ελαττωθούν ακόμα περισσότερο οι ανεπιθύμητες αιμορραγικές επιπλοκές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991 Mar 22;64(6):1057–68.
2. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):938–49.
3. Chan NC, Weitz JI. Antithrombotic agents: new directions in antithrombotic therapy. *Circulation Research*. 2019;124(3):426–36.
4. Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs)—focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Communication and Signaling*. 2013;11(1):1–26.
5. Mackie EJ, Pagel CN, Smith R, de Niese MR, Song SJ, Pike RN. Protease-activated receptors: a means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals. *IUBMB Life*. 2002 Jun;53(6):277–81.
6. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6642–6.
7. Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153 Suppl 1:S263-282.
8. Ramachandran R, Noorbakhsh F, Defea K, Hollenberg MD. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Jan 3;11(1):69–86.
9. Abraham LA, MacKie EJ. Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *J Bone Miner Res*. 1999 Aug;14(8):1320–9.
10. Said H.M. (2018). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Academic Press.
11. Lewkowich IP, Day SB, Ledford JR, Zhou P, Dienger K, Wills-Karp M, et al. Protease-activated receptor 2 activation of myeloid dendritic cells regulates allergic airway inflammation. *Respir Res*. 2011 Sep 21;12:122.
12. Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, et al. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br J Pharmacol*. 2007 Jan;150(2):176–85.

13. Han X, Nieman MT, Kerlin BA. Protease-activated receptors: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021 Jan;5(1):17–26.
14. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1800–14.
15. Colman RW, Hirsch J, Marder V, Salzman E, Francis J. Hemostasis and Thrombosis: Basic: Principles and Clinical Practice. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1995;6(2):147.
16. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1374–83.
17. Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol*. 1998 Sep;8(9):359–64.
18. Bahou WF et al, Chromosomal assignment of the human thrombin receptor gene localization to region q13 of chromosome5, Sept1993, *Blood* 82(5):1532-7.
19. Martorell L, Martínez-González J, Rodríguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2008 Feb;99(2):305–15.
20. Majumdar M, Tarui T, Shi B, Akakura N, Ruf W, Takada Y. Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin alpha(9)beta(1). *J Biol Chem*. 2004 Sep 3;279(36):37528–34.
21. O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, et al. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem*. 2000 Dec 5;275(18):13502–9.
22. Flaumenhaft R, De Ceunynck K. Targeting PAR1: Now What? *Trends Pharmacol Sci*. 2017 Aug;38(8):701–16.
23. Merck Statement on FDA Advisory Committee for Vorapaxar, Merck's Investigational Antiplatelet Medicine [Internet]. Merck.com. [cited 2022 May 21]. Available from:

<https://www.merck.com/news/merck-statement-on-fda-advisory-committee-for-vorapaxar-mercks-investigational-antiplatelet-medicine/>.

24. Cunningham M, McIntosh K, Bushell T, Sloan G, Plevin R. Proteinase-activated receptors (PARs) as targets for antiplatelet therapy. *Biochem Soc Trans.* 2016 Apr 15;44(2):606–12.
25. Μοσχονάς Η., και Τσελέπης Α., (2014). Ανταγωνιστές του Αιμοπεταλιακού Υποδοχέα PAR-1. Θα έχουν Θέση στη Σύγχρονη Αντιαιμοπεταλιακή Αγωγή; *Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση*, 55(4), 310-319.
26. Goto S, Ogawa H, Takeuchi M, Flather MD, Bhatt DL, J-LANCELOT (Japanese-Lesson from Antagonizing the Cellular Effect of Thrombin) Investigators. Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2010 Nov;31(21):2601–13.
27. Xu H, Tilley DG. Pepducin-mediated GPCR signaling in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2022 Feb 11;
28. Day RA, Gastel B. How to write and publish a scientific paper. Cambridge University Press;
29. Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010 Jan;31(1):17–28.
30. Goto S, Ogawa H, Takeuchi M, Flather MD, Bhatt DL, J-LANCELOT (Japanese-Lesson from Antagonizing the Cellular Effect of Thrombin) Investigators. Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2010 Nov;31(21):2601–13.
31. Mehta SR, Yusuf S, Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) Study Investigators. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme; rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J.* 2000 Dec;21(24):2033–41.

32. Bovill EG, Terrin ML, Stump DC, Berke AD, Frederick M, Collen D, et al. Hemorrhagic events during therapy with recombinant tissue-type plasminogen activator, heparin, and aspirin for acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI), Phase II Trial. *Ann Intern Med.* 1991 Aug 15;115(4):256–65.
33. O'Donoghue ML, Bhatt DL, Wiviott SD, Goodman SG, Fitzgerald DJ, Angiolillo DJ, et al. Safety and tolerability of atropaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: the lessons from antagonizing the cellular effects of Thrombin–Acute Coronary Syndromes Trial. *Circulation.* 2011 Dec 3;123(17):1843–53.
34. Cho JR, Rollini F, Franchi F, Ferrante E, Angiolillo DJ. Unmet needs in the management of acute myocardial infarction: role of novel protease-activated receptor-1 antagonist vorapaxar. *Vasc Health Risk Manag.* 2014;10:177–88.
35. TRA*CER Executive and Steering Committees. The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA*CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J.* 2009 Sep;158(3):327-334.e4.
36. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, Ameriso SF, Dalby AJ, Fish MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2012 Apr 12;366(15):1404–13.
37. van Diepen S, Tricoci P, Podder M, Westerhout CM, Aylward PE, Held C, et al. Efficacy and Safety of Vorapaxar in Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome Patients Undergoing Noncardiac Surgery. *J Am Heart Assoc.* 2015 Dec 15;4(12):e002546.
38. Gusto Investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine.* 1993;329(10):673–82.
39. Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF

- release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 4;102(1):216–20.
40. Rwibasira Rudinga G, Khan GJ, Kong Y. Protease-Activated Receptor 4 (PAR4): A Promising Target for Antiplatelet Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 14;19(2):E573.
41. Ramachandran R, Mihara K, Thibeault P, Vanderboor CM, Petri B, Saifeddine M, et al. Targeting a Proteinase-Activated Receptor 4 (PAR4) Carboxyl Terminal Motif to Regulate Platelet Function. *Mol Pharmacol*. 2017 Apr;91(4):287–95.
42. Meah MN, Raftis J, Wilson SJ, Perera V, Garonzik SM, Murthy B, et al. Antithrombotic Effects of Combined PAR (Protease-Activated Receptor)-4 Antagonism and Factor Xa Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Nov;40(11):2678–85.
43. Mackman N, Bergmeier W, Stouffer GA, Weitz JI. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 May;19(5):333–52.
44. O’Callaghan K, Kuliopulos A, Covic L. Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development. *J Biol Chem*. 2012 Apr 13;287(16):12787–96.
45. Zhang P, Gruber A, Kasuda S, Kimmelstiel C, O’Callaghan K, Cox DH, et al. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin. *Circulation*. 2012 Jul 3;126(1):83–91.
46. Rana R, Huang T, Koukos G, Fletcher EK, Turner SE, Shearer A, et al. Noncanonical Matrix Metalloprotease 1-Protease-Activated Receptor 1 Signaling Drives Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Jun;38(6):1368–80.
47. Kuliopulos A, Gurbel PA, Rade JJ, Kimmelstiel CD, Turner SE, Bliden KP, et al. PAR1 (Protease-Activated Receptor 1) Pepducin Therapy Targeting Myocardial Necrosis in Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome Patients

Undergoing Cardiac Catheterization: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2 Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Dec;40(12):2990–3003.

48. Kamato D, Burch ML, Osman N, Zheng W, Little PJ. Therapeutic implications of endothelin and thrombin G-protein-coupled receptor transactivation of tyrosine and serine/threonine kinase cell surface receptors. *J Pharm Pharmacol.* 2013 Apr;65(4):465–73.
49. Bliden K, Chaudhary R, Kuliopulos A, Tran H, Taheri H, Tehrani B, et al. Effects of vorapaxar on clot characteristics, coagulation, inflammation, and platelet and endothelial function in patients treated with mono- and dual-antiplatelet therapy. *J Thromb Haemost.* 2020 Jan;18(1):23–35.