



ARAŞTIRMA MAKALESİ/RESEARCH ARTICLE

HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLIL HEPARİNİN ALTERNATİF YOLLARDAN UYGULANMASI Canan İSKENDERÖĞLU¹, Füsün ACARTÜRK²

ÖZ

Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikoagülanlardır. Antikoagülan tedavideki ilerlemeler, subkütan (*sc*) injeksiyondan sonra minimum kanama ve farmakokinetik parametreler yönünden DMAH'in, heparinle karşılaştırıldığında gelişmiş bir antikoagülan olmasına yol açmıştır. Heparin ve DMAH membranlardan geçemediğinden parenteral olarak (*sc*, *iv*) uygulanmaktadır.

Parenteral uygulamanın yarattığı sorunları ortadan kaldırmak amacıyla alternatif veriliş yolları araştırılmaktadır. Bu amaçla heparin ve DMAH'in, oral, rektal, transdermal ve nazal yollardan uygulanmak üzere çeşitli formülasyonları hazırlanmıştır. Alternatif uygulama amacıyla, önceleri heparinin emülsiyonu, lipozomu, çeşitli tuzları ve kompleksleri hazırlanmıştır. Daha sonra ise heparin ve DMAH ile çoğunlukla mikropartiküler sistemler ve emilim artırıcı madde içeren formülasyonlar hazırlanmıştır. Emilim artırıcı olarak en çok tercih edilen madde N-(8-[2-hidroksibenzoil]amino) kaprilattır (SNAC). SNAC ile hazırlanmış ve klinik deneme aşamasında olan oral heparin preparatı da mevcuttur. Son yıllarda ise avantajları nedeniyle DMAH, heparine göre daha çok tercih edilmektedir. Sonuçlar heparinin ve DMAH'in oral uygulamasına yönelik ticari preparatların önümüzdeki yıllarda kullanılacağını göstermektedir.

Bu derlemede heparin ve DMAH ile ilgili genel bilgiler ve şimdiye kadar yapılmış olan alternatif uygulama yollarına yönelik çalışmalardan örnekler verilecektir.

Anahtar Kelimeler: Heparin, Düşük molekül ağırlıklı heparin, Antikoagülan, Heparin formülasyonları, Düşük molekül ağırlıklı heparin formülasyonları

ADMINISTRATION OF HEPARIN AND LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARİN BY ALTERNATIVE ROUTES

ABSTRACT

Heparin and low molecular weight heparin (LMWH) are widely used as anticoagulants in the prevention and the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Advances in anticoagulant therapy have led to LMWH as improved anticoagulants compared to heparin with respect to pharmacokinetic parameters and minimal hemorrhage after subcutaneous injection. Heparin and LMWH are not penetrated through membranes. Because of this reason heparin and LMWH have been administered by parenterally .

To overcome the problems regarding to parenteral administration of heparin, alternative delivery routes have been investigated. For this purpose, several formulations of heparin and LMWH have been prepared for oral, rectal, transdermal and nasal administration. Several formulations of heparin such as emulsion, liposom, salt and complexes for alternative delivery have been developed in earlier studies. Then, microparticulate systems and some formulations containing penetration enhancers with heparin and LMWH were mostly prepared recently. Sodium N-(8-[2-hydroxybenzoyl]amino) caprilat (SNAC) is the most preferred penetration enhancer. Oral heparin product containing SNAC, is at the clinical trial stage. Recently, LMWH has been much more preferred because of its advantages. The results of the studies show that commercial heparin and LMWH products for oral administration will be used in the near future.

In this review, general knowledges about heparin and LMWH and some example from the formulation studies regarding to alternative administration routes up to now were given.

¹ Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, İlaç ve Kozmetik Araştırma Müdürlüğü, 06100 Sıhhiye-Ankara

² Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji A.B.D., 06330, Etiler-Ankara

Tel: 0 312 2139691, 0312 212 2107; **Faks:** 0 312 212 7958; **E-posta:** :facar@tr.net

Keywords: Heparin, Low molecular weight heparin, Anticoagulant, Heparin formulations, Low molecular weight heparin formulations

1. GİRİŞ

Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikoagülanlardır (Bick, 2000; Majerus vd, 1990; Verstraete ve Wessler, 1992; O'Reilly, 1995). Heparin membranlardan geçemediği için parenteral (*iv*, *sc*) olarak uygulanmaktadır (Myeck vd, 1997). Ancak heparin ve DMAH ile alternatif uygulama yollarına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalara geçilmeden önce heparin ve DMAH ilgili genel bilgiler verilerek, farmakolojileri ve kullanımlarına değinilecektir.

Heparin ilk kez, 1916 yılında karaciğerden izole edilmiştir. Antikoagülan özellikteki bu maddeye karaciğerde lokalize olması nedeniyle "heparin" ismi verilmiştir (Majerus vd, 1990).

Heparin, sığır akciğerinden veya domuz, koyun ve sığırların ince barsaklarından elde edilir (European Pharmacopoeia, 2005).

Heparin, tedavideki üstünlüğü ve oral antikoagülanlara göre daha güvenilir olması nedeniyle oldukça tercih edilen bir antikoagülan maddedir (Goth, 1976). Heparinin plasentadan geçmemesi, etkisinin hızlı ortaya çıkması ve tedavinin kesilmesiyle de hızla ortadan kalkması avantaj sağlar (Myeck vd, 1998)

DMAH'ler ile ilgili gelişmeler ise 1970'lerin ortası ve 1980'lerin başından itibaren hız kazanmıştır. Bunda, heparinden elde edilen DMAH'in, aPTZ'yi uzatma etkinliğinin ortadan kalkması fakat faktör Xa'yı inhibe etme etkisinin devam etmesi ve eşit antitrombotik etkiye karşılık, heparine göre kanama yapma riskini azaltması rol oynamıştır (Hirsh, 2001). DMAH'lerin molekül ağırlığı 5000-8000 arasındadır. DMAH'ler, heparinin fraksiyonlanması veya depolimerizasyonu ile elde edilebilirler. Piyasada farklı isimler altında bulunan ve farklı depolimerizasyon yöntemleriyle hazırlanan DMAH'ler, temelde aynı yapıda olmakla birlikte farmakokinetik özellikler ve antikoagülan etki açısından birtakım farklılıklar gösterebilmektedir (Linhardt vd, 1999).

Farklı kaynaklı heparinler fraksiyonlandırılarak, fraksiyonların özellikleri fizikokimyasal ve biyolojik yöntemlerle incelenmiş ve bazı yöntemler arasındaki korelasyon tesbit edilmiştir (Özsoy, 1989, Bilaç vd, 1990).

1.1 Heparinin Yapısı, Farmakolojisi ve Kullanımı

Heparin, doğrusal zincir yapısında, sülfatlanmış, kompleks bir mukopolisakarittir. Hidrofilik özellikte olan heparinin molekül ağırlığı 6000-30000 Dalton arasında değişir (Merck Index, 1989).

Heparinin % 1'lik sulu çözeltisinin pH'sı 6-8 civarındadır (British Pharmacopoeia, 1993; Verstraete ve Wessler, 1992). İlacın kandan uzaklaşması 1. derece kinetiklerdir. Antikoagülan etkinin yarı ömrü uygulanan doza bağlıdır. Heparinin 100, 400 ve 800 IU/kg *iv* enjeksiyonu sonucu antikoagülan aktivitenin yarı ömrü sırasıyla 1, 2.5, ve 5 saattir (Majerus vd, 1990).

Heparinin etki mekanizması, kanda inaktif durumda bulunan antitrombin III'ü (AIII) aktif duruma getirmesine dayanır. AIII, aktive edilmiş enzimatik pıhtılaşma faktörlerini (trombin, faktör Xa, faktör XII, faktör XI, faktör VII, kallikrein gibi) inhibe ederek pıhtılaşmayı bloke eder (Şekil 1) (Verstraete ve Wessler, 1992). Ayrıca, heparinin damar endotelinde birikerek yaptığı elektronegatif etki trombosit agregasyonunu önleyebilmektedir. Düşük dozda uygulanan heparin, kan pıhtılaşma zamanında belirgin bir uzama yapmadan antitrombotik etki oluşturabilir (Kayaalp, 1992).

Heparin, antikoagülan etki yapmayan dozlarda (çok düşük dozlarda) uygulandığında, lipoprotein lipaz enziminin dolaşıma salımını sağlayarak lipemiyi berraklaştırıcı etki gösterir (Majerus vd, 1990). Yani yağdan zengin besin yedikten sonra insanda, plazmada oluşan bulanıklık, heparin injekte edildiğinde yok olur. Lipemiyi berraklaştırıcı etki kilomikronların lipoprotein lipaz tarafından parçalanmasına bağlıdır (Goth, 1976). Sonuçta, serbest yağ asiti konsantrasyonu yükselir. Bu durumun, hiperlipideminin tedavisi yönünden pratik bir önemi yoktur (Kayaalp, 1992).

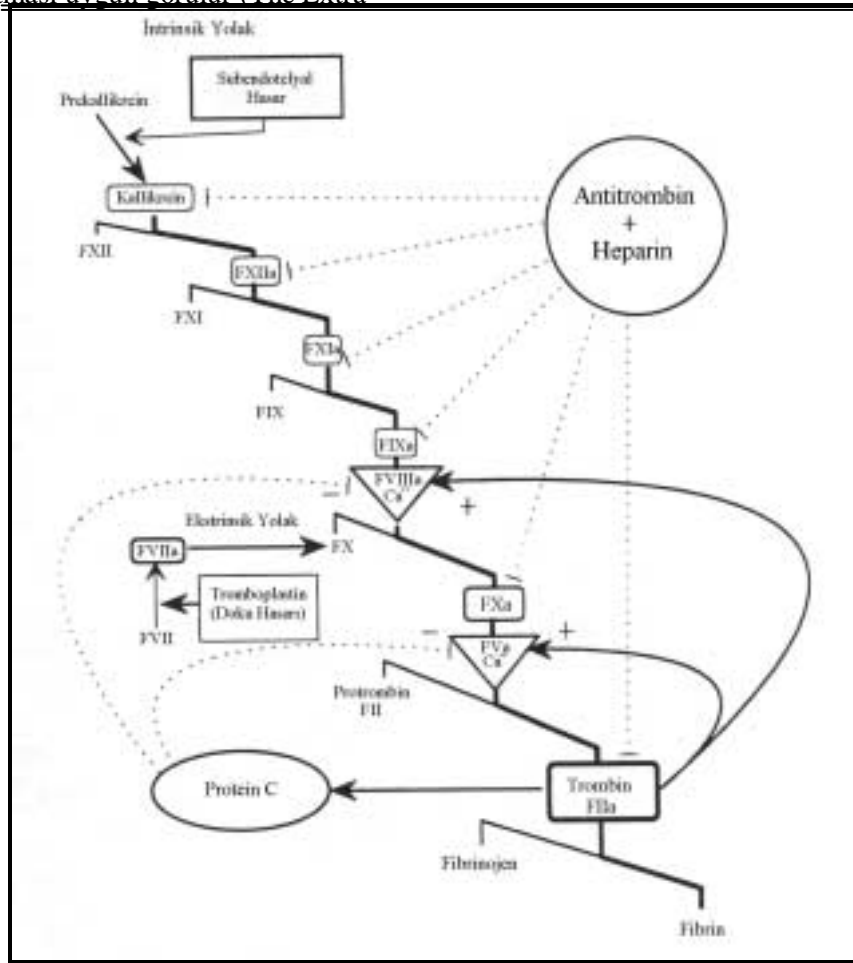
Ticari heparin, değişik molekül ağırlığında bir molekül ailesi içerdiğinden verilen heparinin konsantrasyonu ve pıhtılaşma üzerine etkisinin korelasyonu genellikle düşüktür. Bu nedenle heparinin etkinliği biyolojik ünite ile belirlenir (O'Reilly, 1995).

Heparin, pulmoner embolizmi ve derin ven trombozunu önlemek ve gelişmesini durdurmak amacıyla, ayrıca postoperatif tromboz profilaksisinde ve venöz tromboemboli riskinin arttığı durumlarda da kullanılır (Bick, 2000, Majerus vd, 1990, Verstraete ve Wessler, 1992).

Heparinin *iv* infüzyonla uygulanmasında, başlangıçta infüzyon borusuna 5000 ünite heparin injekte edilir; daha sonra 24 saatte bir 20000-30000 ünite heparin % 5'lik dekstroz çözeltisi içinde, yaklaşık 0.5 ünite.kg⁻¹.dk⁻¹ hızla verilir. Sonraki günlerde hız, test sonuçlarına göre ayarlanır. Heparinin *iv* enjeksiyonla uygulanmasında, başlangıçta 5000 ünite, sonra 4 saatte bir 5000-10000 ünite verilir. Heparin *sc* uygulanacaksa, 12 saatte bir 12500 ünite verilir (Kayaalp, 1992).

Heparin dozunun ayarlanması için hastalarda aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ) ve

aktive edilmiş koagülasyon zamanı (aKZ) testleri yapılır. Heparin tedavisi sırasında aPTZ'nin 1.5-2, aKZ'nin 2.5-3 kat artması uygun görülür (The Extra



Şekil 1. Koagülasyon Şeması (Verstraete ve Wessler, 1992).

Pharmacopoeia, 1989). İnsanlarda normal aPTZ değeri 24-36 sn, aKZ değeri ise 80-130 sn'dir. aPTZ testi, duyarlı, ucuz, tutarlı ve rutin olarak kullanılan bir testtir. aPTZ koagülasyonunun intrinsik yolağının ve faktör XII, yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK), prekallikrein, XI, IX ve VIII'ün yeterli olup olmadığını gösterir. Aktive edilmemiş kan kullanıldığında pıhtılaşma uzun zaman alır, değişkenlik fazladır ve tekrarlanabilirlik düşüktür (Kayaalp, 1992).

Heparinin, biyolojik yöntemlerin yanı sıra fizikokimyasal yöntemlerle de örneğin çeşitli boyamaddeleri ile tayini yapılmaktadır (Güven ve Ertan, 1984a, Smith vd, 1980). Çeşitli fizikokimyasal ve biyolojik tayin yöntemleri incelenmiş ve bazı yöntemler arasındaki korelasyon kanıtlanmıştır (Güven ve Ertan, 1984b, Güven ve Ertan, 1984c, Güven ve Ertan, 1985).

Heparin, yüksek dozda uzun süre kullanıldığında, spontan kanamalara ve osteoporozu neden olabilir. Ayrıca, uzun süre kullanıldığında seyrek de olsa, trombositopeniye (trombositlerin azalması) ve trombosit agregasyonuna yol açabilir. Doz aşımında heparinin antidotu olan protamin sülfat *iv* yoldan verilir (Goth, 1976).

1.2 Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Yapısı, Farmakolojisi ve Kullanımı

DMAH'lerin molekül ağırlıkları, spesifik aktiviteleri (Anti- Xa/ Anti Ila aktivitesi oranı) ve plazma klerensleri farklıdır ve farklı dozlarda kullanılırlar (Hirsh ve Levine, 1992). Farmakokinetik özellikler ve antikoagülan etki açısından farklılıklar gösterdiklerinden, klinikte birbirinin yerine kullanılamazlar (Hirsh, 2001). DMAH'lerin antifaktör Xa aktivitesi 70 U.mg⁻¹'dan fazla olmalıdır (European Pharmacopoeia, 2005).

DMAH'nin antitrombotik etkinliği, fraksiyonlanmamış heparin (uzun zincirli mukopolisakkarit olan heparinin farklı molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlanmamış şekli) ile yaklaşık eşit iken, antihemostatik (kanama yapıcı) etkinliği daha azdır. DMAH'nin yarılanma ömrü heparinden daha uzun, biyoyararlanımı daha yüksektir (Kayaalp, 1992). DMAH'nin antitrombin etkisi düşükken, anti-faktör Xa etkinliği (pıhtılaşma ortak yolağında rol alan faktör Xa'yı inhibe etme etkinliği) daha güçlüdür.

DMAH'nin aPTZ'yi uzatma yeteneği düşük olduğundan, dozun titre edilmesi için genellikle aPTZ değil, anti-faktör Xa aktivite testi kullanılır. Akut pulmoner embolide DMAH'in sc uygulanması ile fraksiyonlanmamış heparinin iv uygulanması durumunda etkinliklerinin 612 hastada karşılaştırıldığı bir çalışmada, 8 gün ve 90 gün sonraki tedavi kıyaslanmıştır. Tedavi oranı, ilk 8 günün sonunda fraksiyonlanmamış heparin ile % 2.9, DMAH ile % 3 olurken, 90 gün sonra fraksiyonlanmamış heparinle % 7.1 ve DMAH ile % 5.9 olmuştur. Büyük kanama riski her iki grupta benzer çıkmıştır. Sonuçta, bu çalışmada sc DMAH uygulamasının, iv fraksiyonlanmamış heparin uygulaması kadar etkili ve emniyetli olduğu sonucuna varılmıştır (Simonneau vd, 1997).

DMAH'in sc uygulanmasının (günde birkez) ve varfarin sodyum uygulanmasının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, diz ve kalça implantasyonundan sonra derin ven trombozunu önlemek amaçlanmıştır. Toplam 1207 hastanın, ven trombozunu ölçmek amacıyla venogramları çekilmiştir. Derin ven trombozu oranı, varfarinli grupta % 37.4 iken DMAH uygulanan grupta % 31.4 çıkmıştır. Sonuçta, sc uygulanan DMAH'in derin ven tromboz sıklığını varfarine göre daha fazla düşürdüğü gözlenmiştir (Hull vd, 1993).

2. HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ALTERNATİF YOLLARDAN UYGULANMASINA YÖNELİK FORMÜLASYONLAR

Heparin ve DMAH'ler ile farklı dozaj şekilleriyle ve farklı uygulama yollarıyla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Hazırlanan formülasyonlar çözelti, jel, lipozom, yama ve mikropartikül sistemlerdir. Oral uygulamaya yönelik çalışmaların sayıca fazla olması ve son yıllarda uygulama kolaylığı nedeniyle de çalışmalarda daha çok oral yol tercih edildiği için oral uygulamaya yönelik formülasyonlar ayrı bir başlık altında toplanmıştır.

2.1 HEPARİN İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1.1 Çözelti Tipi Formülasyon

Rektal yoldan sıçanlara heparin uygulanan bir çalışmada, heparinin barsaktan emilimine safra tuzlarının etkisini araştırmak amacıyla, sıçanlara verilen heparin çözeltisine sodyum kolat ya da sodyum deoksikolat eklenmiştir. Heparinin emilimi radyoaktif işaretleme ile incelenirken, biyolojik etki plazma lipaz aktivitesi ve parsiyel tromboplastin zamanının (PTZ) uzaması ölçülerek izlenmiştir. Aynı heparin konsantrasyonunda safra tuzu eklenmediği zaman, kanda radyoaktivite gözlenmemiş, PTZ'de uzama ve plazma lipaz aktivitesi oluşmamıştır (Ziv vd, 1983).

2.1.2 Jel Tipi Formülasyon

Heparinin jel tipi formülasyonlarla deriye uygulandığı bir çalışmada Carbopol 934[®], Pluronic F-127[®] ve Methocel J5MS[®] kullanılarak heparinin jel

ve Methocel J5MS[®] kullanılarak heparinin jel formülasyonlarından salımı ve insan derisine penetrasyonu incelenmiştir. Heparinin salım hızı şu sırayla artmıştır: Methocel[®]<Pluronic[®]<Carbopol[®]. Heparinin difüzyon katsayısı ile jel viskozitesi arasında ters ilişki gözlenmiştir. Carbopol[®] jele, % 5 Azon[®] veya % 10 N-metilpirolidon eklenmesiyle heparinin deriden geçişi kontrol jele göre dört kat artmıştır (Bonina vd, 1994).

Vücuda yerleştirilen ve kanla temas eden sistemlerin sebep olduğu trombozun önlenmesi için heparinin sistemik verilmesi yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, bu sistemlerin yüzeylerinin heparin yüklü polimerle kaplanması düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada (Gutowska vd, 1992), N-izopropilakrilamit kopolimeri ile bütül metakrilat (hidrofobik) veya akrilik asit (hidrofilik) ko-monomeri kullanılarak sıcaklığa duyarlı hidrojel sentezlenmiştir. Düşük sıcaklıkta heparin çözeltisi şişmiş olan jele yüklenir ve jel vücutta yüksek sıcaklıkla karşılaştığında büzüşerek heparini salar. Sistemde hidrofobik ko-monomer hız kontrol edici membran gibi davranmaktadır. Heparin yüklemesi sıcaklık, çözelti konsantrasyonu ve jel kompozisyonunun fonksiyonu olarak yapılmıştır. Maksimum heparin yüklemesi, % 4-6 heparin çözeltisi kullanıldığında yapılabilmektedir. Heparinin salım kinetiği ise jel kompozisyonu ve yüklem sıcaklığı ile jelin büzüşme (deswelling) kinetiğinden etkilenmektedir.

Brazel ve arkadaşları (Brazel vd, 1996), poli(N-izopropilamit-ko-metakrilik asit) sentezleyerek bu hidrojele heparin ve streptokinaz yüklemişler ve böylece pH ve sıcaklığa hassas salım elde etmişlerdir. Kullanılan polimerlerden poli(N-izoakrilamit) sıcaklığa, poli(metakrilik asit) ise pH'ya hassastır. Bu şekilde kan pıhtısı civarındaki pH ve sıcaklık değişiminin etkisiyle lokal ilaç salımı sağlanmış olur ve böylece büyük miktar doz uygulamasından ve yan etkilerden kaçınılmış olur.

2.1.3 Lipozom Tipi Formülasyon

Etki süresini uzatmak amacıyla heparin, 0.5-4.0 µm çapında, büyük çok tabakalı lipozomlara hapsedilmiştir. Lipozomlar iv yoldan sıçanlara verilmiş ve antikoagülan aktivite süresinin yaklaşık üç kat arttığı gözlenmiştir (Kim vd, 1986).

Fosfolipon 80 (FL80) ve sfingomiyelin ve bunların karışımları kullanılarak heparin ve DMAH içeren lipozom formülasyonları hazırlanmış ve insan derisinden geçişi *in vitro* olarak incelenmiştir. (Betz vd, 2001). Lipozomlar, etanol injeksiyon metodunun modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Heparin içeren sulu fazın lipit içeren etanol fazına hızla eklenmesiyle ve homojenizatörde karıştırılmasıyla lipozomlar elde edilmiştir. Heparinin epidermal membrana penetrasyonu molekül ağırlığına bağlıdır ve DMAH'in penetrasyonu, heparinden daha fazladır. Heparin, stratum korneumun dış tabakalarında ka-

lrken DMAH daha derin epidermal tabakalara penetre olmuştur. Heparin epidermise sadece FL80 içeren lipozom formülasyonu ile penetre olmuştur. Heparinin epidermise penetrasyonunun, heparinin molekül ağırlığı ve lipozom formülasyonu tarafından etkilendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak DMAH'in kapillerdeki kan konsantrasyonu, farmakolojik etki için gerekli seviye için yeterli olmamıştır.

2.1.4 Partiküler Sistemler

Küçük çaplı vasküler *graftlarda*, bölgesel ve kontrollü heparin salımını sağlayacak bir sistemin amaçlandığı çalışmada heparin ve çeşitli sürfaktanların yüklendiği poli (D,L- laktid-koglikolid 50:50) (PLG) mikroküreler hazırlanmıştır (Kreitz vd, 1997). Mikroküreler mikroporlu poliüretan tüplere yüklenerek parçalanma ve salım özellikleri incelenmiştir. Sürfaktan olarak Lesitin, Span 20, Span 40, Span 60, Span 85 kullanılmış, heparin salımı en fazla Span 85 ve en az Span 40 ile olmuştur. Salım 12 hafta olmuş, ilk 4 saat *burst* etki gözlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise heparin mikroküreleri, biyoparçalanır bir polimer olan poli(D-L-laktik-koglikolik asit) (PLGA) kullanılarak, püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır (Yang, 1999). Bu çalışmada da ateroskleroz, venöz *by-pass*, *graft* hastalıkları ve restenoz gibi hastalıklarda yumuşak doku hücrelerinin (YDH) artışını önlemek için hedef bölgede gerekli ilaç konsantrasyonunun sağlanması ve uzun süreli salımın gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. PLGA ile hazırlanan mikrokürelerle heparinin salım süresi uzamıştır. Koroner *by-pass* ameliyatı olan hastalardan alınan dokularla yapılan deneylerin sonucunda, YDH artışının azaldığı gözlenmiştir.

Yıldız ve arkadaşları (Yıldız vd, 2005) polilaktik asit kullanarak solvan uçurma yöntemiyle hazırladıkları heparin yüklü mikroküreleri nazal olarak sıçanlara uygulamıştır. Polivinil alkol ile emülsiyon oluşturucu maddenin konsantrasyonu ve polimer:ilaç oranları değiştirilerek farklı formülasyonlar oluşturulmuştur. Mikrokürelerin yüzey özelliği, partikül boyutu, verimi, enkapsülasyon etkinliği ve salım özellikleri incelenmiştir. Sonuçta bu formülasyonların uygulanması ile antikoagülan etkinliğin süresinin uzadığı ve bağıl biyoyararlanımın arttığı belirtilmiştir.

2.1.5 Matris

Matris tipi ilaç sistemi olarak poli(allilamin)/heparin kompleksi hazırlanmıştır (Kwon vd 1994). Elektriksel uyarılma ile iki polimerin oluşturduğu kompleks ayrılarak çözünmüştür ve heparin salımı gerçekleşmiştir. Elektriksel uyarılmanın tekrarı ile kontrollü salım amaçlanmıştır ve akımın verildiği basamaklar süresince sabit salım hızı gözlenmiştir.

2.1.6 Yama

Vasküler hasar sonucu oluşan YDH artışını önleyen heparinin perivasküler salımını sağlayan, biyoparçalanır polimerle hazırlanan yama (*wrap*) şeklinde bir sistem geliştirilmiştir. Heparin hapsedilmiş PLGA mikrokürelerinin aljinat jel içine konulmasıyla ince tabakalar oluşturulmuş ve bu tabakalarla hücre kültürlerinde ve sıçanlarda deneyler yapılmıştır. Sonuçta PLGA-aljinat heterojen matrisinden heparin salımı geciktirilmiş; artırılan heparin dozuyla doğru orantılı olarak YDH azalmıştır (Edelman, 2000).

2.2 DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİN İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.2.1 Çözelti Tipi Formülasyon

Nissan ve arkadaşlarının (Nissan vd, 2000) yaptığı çalışmada DMAH, sodyum kolat ile birlikte rektal yoldan çözelti şeklinde sıçanlara ve mikroenema şeklinde sağlıklı gönüllülere verilmiş ve barsaktan emilim gözlenmiştir. Sağlıklı gönüllülere 25000 U DMAH'in 20 mg.mL⁻¹ sodyum kolat ile birlikte mikroenema şeklinde uygulanmasıyla plazma antifaktör Xa seviyesi 15. dakikada 0.38 U.mL⁻¹ bulunmuştur. İstenen etkinin elde edilmesinin yanısıra, DMAH'in sodyum kolat ile birlikte uygulanabileceği ve emniyetli olduğu gözlenmiştir. Ancak uzun süreli plazma seviyesi için yavaş salım yapan bir formülasyonun gerekebileceği belirtilmiştir.

Diğer bir çalışmada, burun damlası şeklinde hazırlanan, DMAH ve fraksiyonlanmamış heparin içeren preparatlar sıçanlarda denenmiştir. Formülasyonlara emilim artırıcı olarak noniyonik yüzey etkin madde olan tetradesilmaltosit (TDM) eklenmiş ve heparin emilimini incelemek amacıyla plazma antifaktör Xa aktivitesi ölçülmüştür. Zamana karşı antifaktör Xa aktivitesinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğriden, eğri altında kalan alan (AUC) ve maksimum plazma seviyesi (C_{max}) hesaplanmış ve % 0.25 TDM eklenmesiyle DMAH'in AUC ve C_{max}'ında belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak, fraksiyonlanmamış heparinde daha düşük bir artış olmuştur. DMAH içeren formülasyonun mutlak biyoyararlanımı % 0.4±0.4'den, TDM varlığında % 19.0±0.3'e yükselmiştir (Arnold vd, 2002).

Heparin ve DMAH çözeltisinin deriden geçişinin düşük frekanslı ultra ses dalgaları (20 kHz) kullanılarak artırıldığı bir çalışmada, *in vitro* domuz derisi ve *in vivo* sıçan derisi kullanılmıştır (Mitragotri vd, 2001). Transdermal olarak verilen heparinin biyolojik aktivitesi antiXa testi ile ölçülmüştür. DMAH konsantrasyonu, derinin geçirgenliği veya uygulama alanı etkin doza ulaşmada etkili faktörlerdir. Sonuçta deriden geçişin arttığı, DMAH ile uzatılmış etki elde edildiği belirtilmiştir.

2.2.2 Jel Tipi Formülasyon

Carbopol 934[®], trietanolin ve propilen glikol kullanılarak DMAH'in jel formülasyonları hazırlanmış ve bazı penetresyon artırıcılar eklenerek insan derisinde in vitro perkütan emilim incelenmiştir (Xiong vd, 1996). Kullanılan penetrasyon artırıcıların etkinlik sıralaması şöyledir: laurokapram (Azone[®]) > nerolidol > 1,8-sineol. Penetrasyon artışı kontrole göre, % 2 laurokapram ile 4.4 kat, % 2 nerolidol ile 2 kat olmuştur. 1,8-sineol, düşük konsantrasyonda kullanıldığında penetrasyonda önemli bir artış sağlamazken, % 10 oranında kullanıldığında DMAH'in akısı 3.5 kat artmıştır.

DMAH ile kitozan ve sodyum aljinat kullanılarak topikal jel formülasyonları hazırlanmıştır (Yıldız vd, 2003). Formülasyonlara penetrasyon artırıcı olarak d-limonen farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir ve selüloz asetat membrandan geçiş incelenmiştir. Sonuç olarak kitozan-aljinat kombinasyonunun DMAH'nin topikal jel formülasyonu hazırlamak için kullanılabilirliği ve d-Limonenin de penetrasyon artırıcı olarak düşünülebileceği belirtilmiştir.

3. HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL UYGULAMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

3.1 Heparinin Oral Formülasyonları

Heparinin oral uygulanmasını sınırlandıran özellikleri, büyük molekül yapısına sahip olması, negatif yük yoğunluğunun yüksek olması, hidrofilik yapıda olması (Rivera vd, 1997) ve yapısı nedeniyle midede kolay parçalanabilir olmasıdır (Jiao vd, 2002a).

Heparinin mideden emilimini ve oral biyoyararlanımını engelleyen bu sebepleri gidermeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

3.1.1 Çözelti Tipi Formülasyon

3.1.1.1 Heparin Kompleksi ve Tuzları ile Çözelti

Heparinin çeşitli maddelerle komplekslerinin ve tuzlarının hazırlanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, gastrointestinal kanaldan geçişi artırmak amacıyla, heparinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi esas alınmıştır.

Heparinin, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ile birlikte oral uygulanmasına yönelik bir çalışmada (Winsdor ve Cronheim, 1961) EDTA tuzları ile hazırlanan heparin kompleksleri ve heparinoitler (sentetik heparin türevleri) kullanılmış, 50 mg⁻¹kg heparin ve 500 mg.kg⁻¹ sodyum EDTA içeren sulu çözelti şeklindeki preparat sıçanlara, 100 mg.kg⁻¹ heparin ve 50 mg.kg⁻¹ sodyum EDTA içeren jelatin kapsüller köpeklerle verilmiştir. Lipemiyi berraklaştırıcı aktivite, sıçanlarda 0.04±0.03'den 1.46±0.17'ye (30. dakika) çıkarken, köpeklerde 0.19±0.18'den, 0.99±0.66'ya (2. saat) yükselmiştir. Pıhtılaşma süresi ise, sıçanlarda 7±1 dakikadan 13.3 dakikaya (30. dakika) yükselirken, köpeklerde 11.3±2.1 dakikadan 44±22

dakikaya (2. saat) yükselmiştir. Sonuçta EDTA'nın alkali tuzu ile verilen heparinin gastrointestinal kanaldan emildiği kararına varılmıştır.

Leone-Bay ve arkadaşlarının (Leone-Bay vd, 1998) yaptığı çalışmada, hazırlanan açillenmiş non α-aminoasit yapısında 10 bileşikle oluşturulan heparin komplekslerinin çözeltileri, sıçanlara ve maymunlara oral yoldan verilmiştir. aPTZ ve antifaktör Xa ölçümleri ile heparinin gastrointestinal emilimi kanıtlanmıştır. Heparin ile açillenmiş non α-aminoasit yapısındaki salım ajanı arasında nonkovalan etkileşme nedeniyle emiliminin sağlandığı yorumu yapılmıştır.

Heparinin safra asitleriyle kompleksinin hazırlanıldığı çalışmalarda çoğunlukla deoksikolik asit (DOCA) tercih edilmiştir. Genellikle gastrointestinal kanal duvarının yapısı bozulmaksızın emilimin artması, hidrofobisitenin artmasına ve DOCA kompleksinin ileumdaki safra asiti reseptörleriyle etkileşmesine bağlanmıştır.

Lee ve arkadaşları (Lee vd, 2000) tarafından farklı mol oranlarında heparin-DOCA kompleksleri hazırlanmış ve sıçanlara oral yoldan verilmiştir. Pıhtılaşma zamanını en çok artıranın, en fazla DOCA oranıyla hazırlanan formülasyon olduğu gözlenmiştir. Mol oranı 10 olan Heparin-DOCA kompleksi ile yapılan deneyde aPTZ değerinin heparinin dozuna bağlı olarak arttığı ve 200 mg.kg⁻¹ heparinle aPTZ'nin 7 kat arttığı gözlenmiştir.

3.1.1.2 Emilim Artırıcı İçeren Çözelti

Oral heparin uygulamasına yönelik olarak, emilimi artırmak amacıyla yapılan çalışmalarda en sık kullanılan madde asetillenmiş aminoasit olan SNAC'dir. SNAC, farmakolojik ve toksikolojik cevap oluşturmada ve gastrointestinal kanalda hasara yol açmaksızın heparinin emilimini artırmaktadır. SNAC'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, heparinin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek ve gastrointestinal kanalı etkileyerek emilimi artırdığı düşünülmektedir.

Heparin ve SNAC'nin, % 25 (h/h) propilen glikol de içeren sulu çözeltilerinin maymunlara oral yoldan verildiği bir çalışmada, aPTZ değerinin arttığı gözlenmiştir (Rivera vd, 1997). SNAC (150 mg.kg⁻¹) varlığında heparin (15, 30, 100 mg.kg⁻¹) uygulandığında, artırılan heparin dozuna bağlı olarak aPTZ değerinin de arttığı belirtilmiştir. İstenmeyen farmakolojik bir etki oluşmadığı gibi gastrointestinal hasar da gözlenmemiştir.

Sağlıklı gönüllülerle yapılan bir çalışmada, 30000 -150000 IU arasında değişen dozlarda heparin çözeltilisine 2.25 g SNAC eklenerek formülasyonlar hazırlanmış ve gönüllülere verilmiştir (Banghman vd, 1998). Anti-Xa'nın, heparin dozunun artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Doku faktör yolağı inhibitörü (DFYİ) konsantrasyonu bu çalışmada 2.5-3 kat artmıştır. Doku faktörüne bağlı yolak kısa sürede

plıtlı oluşumunu sağlamaktadır. Daha önceki çalışmalarda DFYİ'nün 7500 U heparinin *iv* uygulanmasından sonra 1.5-6.5 kat arttığı bildirilmiştir; böylece heparinin antikoagülan yanıtında bireylerarası değişkenlik olabileceği gösterilmiştir. Kullanılan dozda SNAC miktarıyla yan etki gözlenmemiştir.

Gonze ve arkadaşları (Gonze vd, 1998), sıçanlarda derin ven trombozunu önlemek için oral heparin uygularken, emilim artırıcı olarak SNAC kullanmışlardır. Oral gavajla 300 IU.kg⁻¹ SNAC ve 300 IU.kg⁻¹ heparin içeren preparat verilmiştir. aPTZ'nin normal seviyesinin 1.87 katına çıktığı, tromboz oluşumunun % 25'e düştüğü gözlenmiştir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, SNAC'nin, heparine nonkovalan bağlanarak lipofilitesini artırdığı ve barsak lümeninden taşınarak sistemik dolaşıma geçmesini sağladığı sonucuna varılmıştır.

Aynı grubun diğer bir çalışmasında, SNAC ve heparin içeren preparatlar derin ven trombozu oluşturulan sıçanlara oral yoldan uygulamıştır (Gonze vd, 2000). Derin ven trombozu oluşturduktan sonraki 7 günlük tedavi sonucunda, derin ven trombozu oranı kontrol grubunda % 100 iken, 30 mg.kg⁻¹ heparin ve 300 mg.kg⁻¹ SNAC içeren preparatın günde üç kez verilmesiyle % 10 olmuştur. Bu düzey 5 mg.kg⁻¹ DMAH içeren ticari heparin (*sc*) preparatının uygulanmasıyla elde edilen sonuçla aynı çıkmıştır

SNAC kullanılarak oral heparin uygulamasıyla ilgili diğer bir çalışma, damar zedelenmesi sonucu oluşan neointimal hiperplaziyi önlemek amacıyla yapılmıştır (Welt vd, 2001). Neointimal hiperplazi damar içinde yeni tabaka oluşumu ve büyümesidir. Bu durumda uzun süreli ve tekrarlayan dozlar heparin tedavisi gerekir; dolayısıyla oral uygulamanın önemi artar. Çalışmada *stent* ve balon ile damarları açılan tavşanların, heparin tedavisi uygulandıktan sonra damarları alınarak incelenmiş, damardaki daralmayı önlemede SNAC ile birlikte oral heparin uygulamasının etkili olduğu gözlenmiştir

SNAC ile beraber verilen heparinin oral emilim yolunu incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, Caco-2 tek tabaka hücreleri ve floresan mikroskopisi kullanılmıştır (Malkov vd, 2002). SNAC varlığında heparinin Caco-2 hücrelerinden geçişinin selektif olduğu (spesifik bir mekanizma), plazma membran geçirgenliğiyle veya sıkı bağlanma noktalarının (*tight junction*) açılmasıyla ilgili olmadığı belirtilmiştir. SNAC-heparin kompleksinin (nonkovalan bağlanma), tek başına heparinden daha lipofilik bir yapı oluşturarak hücre membranından pasif difüzyona uğrayıp, sonra kan dolaşımına geçtiği ve daha sonra ayrılıyor olabileceği belirtilmiştir

Emisphere firması tarafından, heparinin SNAC ile hazırlanmış oral sıvı dozaj şekli faz III klinik çalışmaları aşamasındadır (Lawrence R.M., 2001). Ayrıca, oral katı heparin preparatı hazırlamak için doğrudan basım ajanı olan mikrokristal selülozun

konsantrasyonunun ve granülasyon işleminin etkileri incelenmiştir (Sharma, 2001). Granülasyon ve kurutma şartlarının SNAC'nin kristal özelliklerini değiştirmedeği gözlenmiştir. Aynı firmanın, SNAC'nin modifikasyonu geliştirdiği N-[10-(2-hidroksi benzoil) amino] dekonat (SNAD) isimli salım ajanıyla hazırladığı oral heparin tabletleri Faz I çalışmaları aşamasındadır (Cavalla, D., 2001)

3.1.2 Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Tipi Formülasyon

Emülsiyon şeklinde yapılan çalışmada, su-yağ emülsiyonu hazırlanmış ve heparin emilimine, emülsiyon bileşenlerinin oranlarının etkisi incelenmiştir (Engel ve Riggi, 1969). Bu amaçla lipemiyi berraklaştırıcı etki incelenmiş ve heparin emiliminin emülsiyondaki yağ damlacıklarının büyüklüğü ve total yüzey alanı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir

Küçük partiküllü heparin/kitozan kompleksi içeren mikroemülsiyonun hazırlanması çalışmada ise mikroemülsiyonun bulanıklık, damlacık büyüklüğü gibi özellikleri araştırılmıştır (Andersson vd, 2003). Mikroemülsiyon (s/y) damlacıkları içinde nanopartikül boyutunda kitozan/heparin kompleksi oluşmuştur. Sonuçta, heparinin oral uygulaması için mikroemülsiyonla oluşturulan heparin-kitozan kompleksinin kullanılabileceği belirtilmiştir.

3.1.3 Lipozom Tipi Formülasyon

Heparinin lipozom şeklindeki preparatlarının hazırlanması, gastrointestinal kanalda heparinin parçalanmasını önlemeye yönelik olmuştur. Lipozomun yüzey yükü emilimde önemli bir etkidir. Ueno ve arkadaşlarının (Ueno vd, 1987) yaptığı çalışmada, negatif ve pozitif yüklü heparin lipozomları hazırlanmış ve oral yoldan uygulanmıştır. Pozitif yüklü lipozomlar, % 10 stearilamin ve % 90 fosfatidilkolin kullanılarak hazırlanmıştır ve gastrointestinal kanaldan en fazla heparin emilimini sağlayan bu grup olmuştur. Yüklü lipozomun absorbe olmadığı, fakat midede parçalandıktan sonra ya da barsak mukoza hücrelerinde intraselüler sindirime uğradıktan sonra venöz dolaşıma geçtiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, lipozomla gastrointestinal parçalanmadan korunma sağlandığı ve pozitif yüklü lipitlerin gastrointestinal emilimi kolaylaştırdığı belirtilmiştir.

3.1.4 Partiküler Sistemler

Mikropartikül ve nanopartiküller ile oral heparin uygulamasına yönelik çalışmalarda çeşitli polimerler ve polimer kombinasyonları kullanılarak, bunların ilaç salımına etkileri incelenmiştir (Jiao vd, 2002 a; 2002 b, 2002 c). Bu çalışmalarda çok fazla miktarda heparin kullanmaksızın, oral yoldan istenilen etkiye ulaşılması ve polimerlerin yan etkilerinin olmaması avantaj olarak belirtilmiştir.

Jiao ve arkadaşlarının (Jiao vd, 2001) yaptığı çalışmada, biyoparçalanır polimerler, poli-ε-

kaprolakton (PCL), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve pozitif yüklü biyoparçalanmaz polimerler, Eudragit® RS ve RL, tek başlarına veya kombinasyonları kullanılarak, çift emülsiyon ve solvan evaporasyon tekniğiyle nanopartiküller hazırlanmıştır. Eudragit® içeren formülasyonlarda ilaç yüklenme oranı artarken, *in vitro* salımın yavaşladığı gözlenmiştir. Araştırmacılar aynı polimerleri ve karışımlarını kullanarak hazırladıkları heparin yüklü nanopartikülleri oral yoldan tavşanlara uygulamıştır (Jiao vd, 2002a). Heparin (600 IU.kg^{-1}) yüklü nanopartiküllerden oluşan tüm formülasyonlarla antifaktör Xa aktivitesi ve aPTZ değeri artmıştır. Heparin içeren Eudragit® RL/PCL nanopartiküllerinin oral uygulanmasından 7 saat sonra, aPTZ düzeyinin iki kat arttığı ve mutlak biyoyararlanımın % 23 bulunduğu belirtilmiştir.

Araştırmacılar (Jiao vd, 2002b) aynı polimer ve polimer kombinasyonlarının yanısıra jelatin de kullanarak s/y/s emülsiyon ve evaporasyon yöntemiyle mikropartikül hazırlamıştır. Polimerlerin ve bazı yardımcı maddelerin, mikropartiküllerin özellikleri ile heparin yüklemesi ve salımı üzerine etkileri incelenmiştir. Çeşitli polimerlerle 80-130 μm olarak elde edilen ortalama çap, dış faza jelatin A eklenmesiyle artmıştır. İlaç yüklenme oranı Eudragit® RS ve RL ile artarken (sırasıyla %49 ve %80), ilaç salımı azalmıştır (sırasıyla %17 ve %3.5).

Başka bir çalışmada PCL ve PLGA ile Eudragit® RS ve RL'nin tek başına veya kombinasyonları halinde kullanılmasıyla ve jelatinin de eklenmesiyle hazırlanan mikropartiküllerde *in vivo* deneyler yapılmıştır. Jelatinli formülasyonlarda salımın hızlı olduğu, Eudragit® içeren PLGA mikrokürelerinde antikoagülan etkinin 4-10 saate kadar uzadığı ve aPTZ değerinin de iki kat arttığı gözlenmiştir (Jiao vd, 2002c).

3.1.5 Ko-matris Sistem

Bir grup araştırmacı farklı polimerler kullanarak heparinle ve aspirinle sinerjik etki sağlamak üzere komatris sistem hazırlamıştır (Vasudev vd, 1997). Çalışmada aspirin yüklenmiş kitozan mikroküreleri, heparin sodyum içeren polietilen vinil asetat (PEVAc) tabakaya dökülmüş, tamamen kurutularak komatris sistem hazırlanmış ve polisitiren butadien ile kaplanmıştır. İlaç salımı, platelet adezyonu ve tromboplastin zamanı ölçümleri, aspirin ve heparinin sinerjik etki gösterdiği bu formülasyonla verilebileceğini kanıtlamıştır.

Aynı grup, diğer çalışmalarında aspirin-heparin komatris sisteminin kalp kapakçıklarının takılmasından sonra gözlenen perikardial kalsifikasyonu önlemede etkili olup olmadığını araştırmışlardır (Vasudev vd, 2000). Sonuçta aspirin-heparin kompleksinin antitrombotik etkisinin yanında perikardial kalsifikasyonu önlemede de başarılı olduğu belirtilmiştir.

3.2 Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Oral Formülasyonları

Son yıllardaki çalışmalarda, genellikle DMAH tercih edilmektedir. Bunun nedeni, DMAH'in eliminasyon yarılanma ömrünün heparinden daha uzun olması, biyoyararlanımının daha yüksek olması ve kanama riskinin daha az olması dolayısıyla hastanın sürekli kontrol altında tutulma zorunluluğunun ortadan kalkması gibi üstünlüklerdir. Ayrıca, molekül ağırlığının küçük olması emilim açısından avantajlıdır. Değişik ilaç şekillerinin uygulanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalara örnekler aşağıda verilmiştir.

3.2.1 Çözelti Tipi Formülasyon

3.2.1.1 Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin ile Çözelti

DMAH çözeltileri oral yoldan 0, 0.25, 0.1, 0.8, 1.7, 3.3, 7.5, 15 mg.kg^{-1} dozlarda sıçanlara verilmiş ve 0.1 mg.kg^{-1} doz ile trombozda % 50 azalma gözlenmiştir (Hiebert vd, 2000). 15 mg.kg^{-1} doz uygulandığında tromboz % 80'den % 16'ya düşmüştür. Endotel heparin seviyesi plazmadan 1000 kat daha fazla bulunmuştur. Bu çalışmada, DMAH ile fraksiyonlanmamış heparin karşılaştırılmış ve DMAH'in daha düşük dozda etkili olduğu belirlenmiştir .

3.2.1.2 Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Kompleksi ile Çözelti

Deoksikolik asit kullanarak DMAH (6kDa) ile hazırlanan 100 mg.kg^{-1} DMAH-DOCA kompleksi oral yoldan çözelti şeklinde uygulanmıştır(Lee vd, 2001). DMAH-DOCA kompleksiyle, gastrointestinal duvarın yapısı değişmeksizin, etkili heparin kan konsantrasyonuna oral yoldan ulaşılabileceği belirtilmiştir.

3.2.1.3 Emilim Artırıcı İçeren Çözelti

DMAH (15 mg.kg^{-1}) ve emilim artırıcı SNAD (300 mg.kg^{-1}) içeren çözelti sıçanlara oral olarak uygulanmış ve trombus oluşumunda azalma gözlenmiştir. Anti-Xa seviyesinin 30. dakikada 1 U.mL-1 olduğu gözlenmiş ve terapötik AntiXa plazma seviyesine ulaşıldığı kanıtlanmıştır (Salartash vd, 1999).

DMAH'in, emilim artırıcı olarak yüzey etkin bir madde olan kaprilokaproil makrogolgliserit (Labrasol) ile beraber uygulandığı çalışma, *in situ* olarak sıçanlarla yapılmıştır. DMAH (200 IU.kg^{-1}) 50 mg.kg^{-1} Labrasol ile birlikte uygulanmış, doudenum, jejunum ve ileumdan DMAH'in emilimi gözlenmiştir. Labrasolün barsaktan emilimi artırdığı, bunun için en etkili bölgenin jejunum olduğu belirtilmiştir. Anti-Xa seviyesi 160 dakika terapötik seviyede

kalmış ve Labrasolün emilim artırıcı etkisi geri dönüşümlü olmuştur (Prasad vd, 2004).

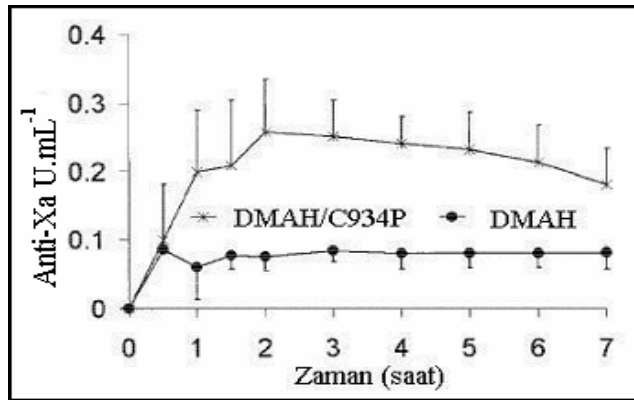
3.2.1.4 Biyoadeziv Polimerlerle Çözelti

Kitozanın poliamfolitik bir türevi olan Mono-N-karboksümetil kitozan (MKK) ile (% 3-% 5 a/h) çözeltileri hazırlanmış, DMAH eklenerek 7200 AntiXa U.kg⁻¹ dozda intradoudenal olarak sıçanlara uygulandığında DMAH'in barsaklardan geçişinin arttığı belirtilmiştir (Thanou vd, 2001a).

Başka bir çalışmada ise %1 Carbopol® 934P içeren çözeltiye DMAH eklenerek (10800 anti-Xa U.kg⁻¹ dozda sıçanlara, 5000 anti-Xa U.kg⁻¹ dozda domuzlara intradoudenal verilmiş ve emilimin arttığı gözlenmiştir. Plazma antiXa seviyeleri sadece DMAH verildiğinde düşük ve terapötik seviyenin altında iken Carbopol® 934P ile beraber DMAH verildiğinde anti-Xa seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2). Carbopol® 934P'nin intraselüler "tight junction"ları etkileyerek paraselüler ilaç permeabilitesini artırdığı düşünülmüştür (Thanou vd, 2001b).

3.2.2 Biozom Tipi Formülasyon

Bohlinder ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Bohlinder vd, 1994), biozom olarak adlandırılan lipit matris sistemler kullanılarak hazırlanan DMAH formülasyonları tavşanlar üzerinde denenmiştir. Biozomlar soya yağı fosfotidil kolini ve orta zincirli monogliserollerden oluşturulmuş ve DMAH yüklenmiştir. DMAH (25 mg.kg⁻¹) içeren biozomlar tavşanlara oral olarak verilmiştir. Biyoyararlanım %15.5±6.1 bulunmuştur.



Şekil 2. Domuzlara intraduodenal olarak kg başına 5000 anti-Xa U DMAH tek başına ve %1 (a/h) Carbopol® 934P (C934P) ile beraber uygulanması ile elde edilen plazma anti-Xa seviyeleri (Thanou vd, 2001b).

3.2.3 Partiküler Sistemler

Heparin ve DMAH ile aljinat-kitozan mikroküre hazırlanıp yüzeyi kitozan ve selüloz asetat ftalat ile kaplanmıştır. Kaplanmış mikrokürelerle kontrollü

salım elde edilmiş ve antikoagulan aktivite gözlenmiştir (Chandy vd, 2002).

Hoffart ve arkadaşları (Hoffart vd, 2002) biyoparçalanır polimerler, PCL, PLGA ve pozitif yüklü biyoparçalanmaz polimerler, Eudragit® RS ve RL'yi tek başına veya kombinasyonları halinde kullanarak, DMAH nanopartikülleri hazırlamıştır. Nanopartiküllerin ortalama çapları 240-490nm bulunmuştur. Eudragit® ile PCL ve PLGA'ya göre ilaç yükleme oranı artmıştır. Tüm formülasyonlarda *in vitro* olarak fosfat tamponunda DMAH'in salımı %10-25 iken, ortama esteraz eklenmesiyle 2-3 kat artmıştır.

PCL, PLGA ve Eudragit® RS ve RL'nin tek başına veya kombinasyonları halinde kullanarak, DMAH mikropartiküllerinin hazırlandığı çalışmada, ilaç yükleme oranı % 16-47 dir (Hoffart vd, 2003). Eudragit® içeren formülasyonlarda ilaç yükleme oranının artması, pozitif yüklü polimerle negatif yüklü DMAH'in etkileşmesi ile açıklanmıştır. Ancak *in vitro* salımın çok az olduğu bunun da güçlü iyonik etkileşmeden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. En fazla salım PLGA ile gözlenmiştir.

3.2.4 Tablet

Tiyollenmiş polikarbofil kullanılarak permeasyonu düzenleyici glutasyon içeren DMAH (279 IU) tabletleri basılmıştır. Tabletler Eudragit 100-55 L ile kaplanarak sıçanlara oral yoldan verilmiştir. Modifiye edilmiş polimerle biyoyararlanımın arttığı gözlenmiştir (Kast vd, 2003).

3.2.5 Kapsül

Andrioli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (Andrioli vd, 1992), DMAH'in diamin tuzunu kapsüller içinde tavşanların doudenularına yerleştirmişlerdir. Emilimin artması ve plazma heparin düzeyinin, heparinin diamin tuzu kullanıldığında sodyum tuzuna göre belirgin seviyede yüksek olması, yeni yapının lipofilitesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Böylece lipofilitesi artan yapının, biyolojik membrandan geçişinin arttığı belirtilmiştir.

4. SONUÇ

Heparinin ve DMAH'in oral emiliminin ve biyoyararlanımının çok düşük olması nedeniyle sadece parenteral kullanılabilmesi, üretim ve kullanım aşamasında bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Parenteral uygulama hasta açısından zordur ve parenteral preparatların hazırlanmasındaki işlemler ve maliyet fazladır. Bu nedenle alternatif uygulama yollarına yönelik formülasyonlar araştırılmıştır.

Rektal, transdermal, nazal ve çoğunlukla da oral yollardan uygulanmak üzere çeşitli formülasyonları hazırlanmıştır. Emülsiyon, lipozom, biozom, jel, matris, tablet, kapsül tipinde formülasyonlar sınırlı sayıda da olsa çalışılmıştır. Daha çok mikropartiküler sistemler ve çözeltiler tercih edilmiştir. Çözeltilerde emilim artırıcı maddeler veya biyoadeziv polimerler

kullanılmıştır. Formülasyonlarda en fazla tercih edilen emilim artırıcı madde SNAC'dir. SNAC ile hazırlanmış ve klinik deneme aşamasında olan oral heparin preparatı da mevcuttur.

Araştırmalarda etkinin uzatılması veya denetimli salım amacıyla daha çok mikropartiküler ve matris sistemler tercih edilmiştir. Bu amaçla farklı polimerler ve polimer karışımları kullanılmıştır. Biyoadeziv polimerler ve emilim artırıcı maddelerle hazırlanan çözelti tipi formülasyonlara da son yıllarda yapılmış çalışmalarda sıklıkla rastlanmaktadır.

Çalışmaların bazılarında dikkat çekici bir nokta etkiye ulaşmak için kullanılan heparin veya DMAH dozlarının farklılık göstermesidir. DMAH'lerin etkinliklerinin farklı olması nedeniyle birbirlerinin yerine kullanılamayacağı bilinmektedir. Ancak kullanılan dozdaki fark bazı çalışmalarda 10 ile 20 kata kadar çıkmıştır.

Son yıllarda ise kanama yapıcı etkinliğin düşüklüğü, hastayı izleme gerektirmemesi gibi üstünlükleri nedeniyle DMAH daha çok tercih edilmektedir. Sonuçlar heparinin ve DMAH'in oral uygulamasına yönelik ticari preparatların önümüzdeki yıllarda kullanıma sunulabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Andersson, M., Löfroth, J.Ö., (2003). Small particles of a heparin/chitosan complex prepared from a pharmaceutically acceptable microemulsion. *Int. J. Pharm.* 257, 305-309.
- Andriouli, G., Caramazza, I., Galimberti, G., Zopetti, G., Benedini F., Sala, Z., Del Soldato, P. (1992). Intraduodenal absorption in the rabbit of a novel heparin salt. *Haemost.* 22, 113-116.
- Arnold, J., Ahsan, F., Meezan, E., Pillion, D.J., (2002). Nasal administration of low molecular weight heparin. *J. Pharm. Sci.* 91, 1707-1714.
- Banghman, R. A., Kapoor, S. C., Agarwal, R. K., Kisicki, J., Catella-Lawson F. and Fitzgerald, G.A. (1998). Oral delivery of anticoagulant doses of heparin a randomized, double blind, controlled study in humans. *Circul.* 98, 1610-1615.
- Betz, G., Nowbakht, P., Imboden, R., Imanidis, G. (2001). Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations in vitro. *Int. J. Pharm.* 228, 147-159.
- Bick, R.L. (2000). Profficient and cost effective approaches for the prevention and treatment of venous thrombosis and thromboembolism. *Drugs* 60, 575-591.
- Bilaç, H., Özsoy, G., Güler, E. (1990). Studies on the fractionation of heparins and the metachromatic and biologic activity determinations on the fractions. *Acta Pharm. Turcica.* 32, 45-54.
- Brazel, C.S., Peppas, N.A. (1996). Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *J. Control. Rel.* 39, 57-64.
- British Pharmacopoeia (1993). 319-323, London Her Majesty's Stationery Office, London.
- Bohlinder, K., Ollson, B., Ragnarrson, G., Singh, S.K., Öhman, G.S., Wadsten, T., Carlsson, A., Herslöf, B. (1994). Use of a novel lipid particle forming, matrix as a drug-carrier system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2, 271-279.
- Bonina F.P., Montenegro, L. (1994). Vehicle effects on in vitro heparin release and skin penetration from different gels, *Int. J. Pharm.* 102, 19-24.
- Cavalla, D. (2001). Improving medicines through drug delivery. *THA News. for the Med. Res.* 7, 2-5.
- Chandy, T., Rao, G.H.R., Wilson R.F., Das, G. S., (2002). Delivery of LMW Heparin via surface coated chitosan/PEG-alginate microspheres prevents thrombosis, *Drug Del.* 9, 87-96.
- Edelman, E.R., Nathan, A., Katada, M., Gates, J., Karnovsky, M.J. (2000). Perivascular graft heparin delivery using biodegradable polymer wraps. *Biomater.* 21, 2279-2286.
- Engel, R.H., Riggi, S.J. (1969). Intestinal absorption of heparin: a study of the interactions of components of oil-in-water emulsions. *J. Pharm. Sci.* 58, 1372-1375.
- European Pharmacopoeia 5, (2005). 2, 1715-1719, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France.
- Gonze, M. D., Manord, J., Leone-Bay, A., Baughman, R. A., Garrard, C. L. Strenbergh, W.C. and Money, S. R. (1998). Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. *Amer. J. Surg.* 176, 176-178.
- Gonze, M. D., Salartash, K., Baughman, R. A., Leone-Bay, A. and Money, S. R. (2000). Orally administered unfractionated heparin with carrier agent is therapeutic for deep venous thrombosis. *Circul.* 101, 2658-2661.
- Goth, A. (1976). Anticoagulant Drugs. Medical Pharmacology. Eight Edition. 441-421, The C. V. Company, Saint Louis.

- Gutowska, A., Bae, Y.H., Feijen, J., Kim, S.W. (1992). Heparin release from thermosensitive hydrogels. *J. Control. Rel.* 22, 95-104.
- Güven, K.C., Ertan, G. (1984a). Metachromatic assay of heparin with different azure dyes. *Acta Pharm. Turc.* 26, 20-23.
- Güven, K.C., Ertan, G. (1984b). The correlation equations for the assay of heparin by metachromatic and thrombin time methods I. *Thromb. Res.* 33, 197-201.
- Güven, K.C., Ertan, G. (1984c). The correlation equations for the assay of heparin by metachromatic and thrombin time methods III. with night blue. *Acta Pharm. Turc.* 26, 63-67.
- Güven, K.C., Ertan, G. (1985). The correlation equations for the assay of heparin by metachromatic and thrombin time methods IV. with methylene blue. *Acta Pharm. Turc.* 26, 63-67.
- Hiebert, L.M., Ping, T., Wice, S.M. (2000). Anti-thrombotic activity of orally administered low molecular weight heparin (Logiparin in a rat model). *Haemost.* 30, 196-233.
- Hirsh, J., Anand, S.S., Halperin, J.L., Fuster, V., (2001). Guide to anticoagulant therapy: heparin, a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circul.* 103, 2994-3018.
- Hirsh, J., Levine, M.N., (1992). Low molecular weight heparin, *Blood*, 79, 1-17.
- Hoffart, V., Y., Ubrich, N., Simonin, C., Babak, V., Vigneron, C., Hofman, M., Lecompte, T., Maincent P. (2002). Low molecular weight heparin loaded polymeric nanoparticles: Formulation, characterization, and release characteristic. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 1091-1099.
- Hoffart, V., Y., Ubrich, N., Lamprcht, A., Bachelier, K., Vigneron, C., Lecompte, T., Hofman, M., Maincent P. (2003). Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable polycationic polymers. *Drug Del.* 10, 1-7.
- Hull, R., Raskob, G., Pineo, G., Rosenbloom, D., Evans, W., Mallory, T., Anquist, K., Smith, F., Hughes, G., Green, D., Elliot, G., Panju, A., Brant, R.A. (1993). Comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with warfarin sodium for prophylaxis against deep-vein thrombosis after hip or knee implantation. *The New Eng. J. Med.* 4, 1370-1376.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart V., Marchand-Arvier M., Vigneron, C., Hofman, M., Maincent P. (2001). Preparation and in vitro evaluation of heparin loaded polymeric nanoparticles. *Drug Del.* 8, 135-141.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier M., Vigneron, C., Hofman, M., Lecompte, Maincent P. (2002a). In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circul.* 105, 230-235.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart V., Marchand-Arvier M., Vigneron, C., Hofman, M., Maincent P., (2002b). Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 28, 1033-1041.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart V., Marchand-Arvier M., Vigneron, C., Hofman, M., Maincent P., (2002c). Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J. Pharm. Sci.* 91, 760-768,
- Kast, C., Guggi, D., Langoth, N., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbo-phil. *Pharm. Res.* 20, 931-936.
- Kayaalp, O. S. (1992). 1386-1437, Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji, Cilt 2, 6. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Kim, T.D., Sakon, M., Kawasaki, T., Kambayashi, J., Oshiro, T., Mori, T. (1986). Studies on liposome-encapsulated heparin. *Thromb. Res.* 43, 603-612.
- Kreitz, M.R., Domm, J.A., Mathiowitz, E. (1997). Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glikolide). *Biomater.* 18, 1645-1651.
- Kwon, I.C., Bae, Y.H., Kim, S.W. (1994). Heparin release from polymer complex. *J. Control. Rel.* 30, 155-159.
- Lawrence, R.N. (2001). News in Brief. *Drug Disc. Tod.* 6, 759-762.
- Lee, Y., Kim, S. H., Byun, Y. (2000). Orally delivery of new heparin derivatives in rats. *Pharm. Res.* 17, 1259-1264.
- Lee, Y., Nam, J. H., Shin, H.C., Byun, Y. (2001). Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent. *Circul.* 104, 3116-3120.
- Leone-Bay, A., Paton, D. R., Leipold, H., Rivera, T., Miura-Fraboni J., Baughman, R.A., Santiago, N. (1998). Acylated non- α -amino acids as

- novel agents for the oral delivery of heparin sodium, *USP. J. Control. Rel.* 50, 41-49.
- Linhardt, R.J., Gunay, N.S., (1999). Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Seminars in Thromb. Hemost.* 25, 5-16.
- Majerus, P. W., Broze, G. J., Midetich, J. P., Tollefsen D. M. (1990). Anticoagulant, Thrombolytic and Antiplatelet Drugs in: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eight Edition (Ed: A.F.G., T.W.R., A.S.N., P.T.), 1311-1331, Pergamon Press, New York.
- Malkov, D., Wang, H., Dinh, S., Gomez-Orellana, I. (2002). Pathway of oral absorption of heparin with sodium n-[8- (2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate, *Pharm. Res.* 19, 1180-1184.
- Merck Index, (1989). 11th Edition, 4688, Merck&Co. Inc., New Jersey.
- Mitragotri, S., Kost, J., (2001). Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound, *Pharm. Res.* 18, 1151-1156.
- Myeck, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., (1997). Pharmacology - Lipincott's Illustrated Reviews. 2nd edition, (Ed:R.A.H., P.A.C), 193-206, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Nissan, A., Ziv, E., Kidron, M., Bar-on, H., Friedman, G., Hyam, E., Eldor, A. (2000). Intestinal absorption of low molecular weight heparin in animals and human subjects, *Haemost.* 30, 225-232.
- O'Reilly, R., (1995). Pıhtılaşma bozukluklarında kullanılan ilaçlar: Temel ve Klinik Farmakoloji, Cilt 2, 6. baskı. (Ed: B. G. Katzung), Çev: Özüner, Z., Süzer, Ö. 672-690., Barış Kitabevi, İstanbul.
- Özsoy, Y., (1989). Heparin Üzerinde Çalışmalar, Doktora tezi, İstanbul Ü. Ecz. Fak., İstanbul.
- Prasad, Y.V.R., Minamimoto, T., Yoshikava, Shibata, N., Mori, S., Matsuura, A., Takada, K., (2004). In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using labrasol as absorption enhancer, *Int. J. Pharm.* 271, 225-232.
- Rivera, T. M., Leone-Bay, A., Paton, D. R., Leipold, H. R., Baughman R. A. (1997). Oral delivery of heparin in combination with sodium n-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]caprylate: pharmacological considerations, *Pharm. Res.* 14, 1830-1834.
- Salartash, K., Gonze, M.D., Leona-Bay, A., Baughman, R., Sternberg, C., Money, S.M. (1999). Oral low-molecular weight heparin and delivery agent prevents jugular venous thrombosis in the rat. *J. Vasc. Surg.* 30, 526-532.
- Sharma, A. N., S. Majuru, S., Bhandarkar, S., R. Agarwal, Baughman, R. A. (2001). Effect of excipient concentration on the physical and mechanical properties of the oral heparin delivery agent SNAC, AAPS Annual Meeting and Exposition, 4718, Colorado.
- Simonneau, G., Sors, H., Charbonnier, B., Page, Y., Laaban, E.F., (1997). A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism, *The New Eng. J. Med.* 337, 663-669.
- Smith, P.K., Mallia, A.K., Hermanson, G.T., (1980). Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations, *Anal. Biochem.* 109, 466-473.
- Thanou., M., Nihot, M.T., Jansen, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., (2001a). Mono-N-Carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo, *J. Pharm. Sci.* 90, 38-46.
- Thanou., M., Verhoef, J.C., Nihot, M.T., Verheijden, H.M., Junginger, H.E., (2001b) Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (LMWH) in rats and pigs using Carbopol® 934P, *Pharm. Res.* 18, 1638-1641.
- The Extra Pharmacopoeia –Martindale(1989). 338-349. Twenty-ninth edition, Ed. Reynolds, J. E.F., The Pharmaceutical Press, London.
- Ueno, M., Nakasaki, T., Adachi, I., Sato, K., Horikoshi, I. (1987). Oral administration of liposomally- entrapped heparin: effect of surface charge of liposome on gastro-intestinal absorption. *Archives of Pract. Pharm.* 47, 56-60.
- Vasudev, S.C., Chandy, T., Sharma, C., (1997). Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin – heparin for preventing cardiovascular thrombosis. *Biomater.* 18, 375-381.
- Vasudev, S.C., Chandy, T., Sharma, C., Mohanty, M., Umasankar, P.R., (2000). Synergistic effect of released aspirin –heparin for preventing bovine pericardial calcification. *Artif. Organs* 24, 129-136.

Verstraete, M. ve Wessler, S., (1992). Heparin and anticoagulants, thrombosis in cardiovascular disorders. (Ed: V.F., M.V.) W.B. Saunders Company Philadelphia, 121-140.

Welt, F. G. P., Woods, T.C. ve Edelman, E. R. (2001). Oral heparin prevents neointimal hyperplasia after injury; inhibitory potential depends on type of vascular injury. *Circul.* 104, 3121-3124.

Winsdor, E., Cronheim, G. E. (1961) Gastrointestinal absorption of heparin and heparinoids. *Nature* 190, 263-264.

Xiong, G. L., Quan, D., Maibach, H. I., (1996). Effects of penetration on in vitro percutaneous absorption of low molecular weight heparin through human skin. *J. Control. Rel.* 42, 289-296.

Yang, Z., Birkenhauer, P., Julmy, F., Chickering, D., Ranieri, J.P., Merkle, H.P., Lüscher, T.F., Gander, B., (1999). Sustained release of heparin from polymeric particles for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Control. Rel.* 60, 269-277.

Yıldız, A., Güngör, S., Özsoy, Y., Araman, A., (2003). In vitro studies on topical gel formulations of low molecular weight heparin, Symp. Skin and Formulations, 23-24 October, 14, Paris.

Yıldız, A., Okyar, A., Baktır, G., Araman, A., Özsoy, Y., (2005). Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly(lactic acid), *Il Farmaco* 60, 919-924.

Ziv, E., Eldor, A., Kleinman, Bar-On, H., Kidron, M. (1983). Bile salts facilitate the absorption of heparin from the intestine. *Biochem. Pharm.* 32, 773-776.

olmuş ve doktora eğitimini 1983 yılında A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda tamamlamıştır. 1988 yılında doçent, 1995 yılında ise profesörlük ünvanını almıştır.

Davetli araştırmacı olarak, Japonya'da , University of Kumamoto, Faculty Pharmaceutical Sciences, Dept. of Pharmaceutics'de, 6 ay, A.B.D.'de , University of Wisconsin, School of Pharmacy, Dept. of Pharmaceutics'de 9 ay süreyle çalışmalar yapmıştır.

Uluslararası ve ulusal bilimsel derneklerin üyesi olup, uluslararası ve ulusal dergilerde yayınlanmış makaleleri ve kitap bölümleri bulunmaktadır.



Canan İskenderoğlu, 1976 yılında Ankara'da doğmuştur. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden, 1998 yılında mezun olarak aynı yıl G.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak girmiş ve yüksek lisans çalışmasına başlamıştır. 2001 yılında yüksek lisans çalışmasını tamamlamıştır. Aynı yıl başladığı doktora tezine devam etmektedir. Halen Refik Saydam Hıfzısıha Merkezi Başkanlığı'nda çalışmaktadır.



Füsun Acartürk, Çorlu'da 1956 yılında doğmuştur. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden, 1978 yılında mezun