

Véralvadásra ható szerek I. rész

Rácz Ákos, Béni Szabolcs

A vérre ható szerek és vérkészítmények az ATC besorolás szerint a B betűjelet (blood) kapták. Csoportjaik a következők:

- ATC B01 – Trombózis kezelésére használatos szerek
- ATC B02 – Vérzéscsillapítók
- ATC B03 – Vérszegénység elleni készítmények
- ATC B05 – Vérpótlók és perfúziós oldatok
- ATC B06 – Egyéb hematológiai szerek

A trombózis kezelésére és megelőzésére használt szerek

A véralvadás nélkülözhetetlen a keringési rendszer fizikai integritásának fenntartásához, az alapfolyamatai bármelyik résztvevőjének kiesése vagy elégtelen funkciója akut életveszélyt, súlyos vérzést eredményezhet, azonban a mindennapok során nagyságrendekkel gyakrabban találkozhatunk ezen folyamatok túlműködésével, vagy a normál biológiai védőszerepükkel össze nem függő helyzetekben történő aktiválódással. Ez leginkább akkor következik be, amikor az erek belső falát borító endotél megsérül, ami többnyire érlemezésedések lerakódások következménye. A kialakuló trombotikus góccok lassan növekednek, és gyakran csak akkor szerzünk a létezésükről tudomást, amikor végzetes érelzáródást okoznak. Ez alól kivételt képez az ún. „aranyér”, valamint a végtagok (döntően az alsó végtagok) felszíni vénáiban növekedésnek induló rögök, melyek már viszonylag korai stádiumban is a beteg számára egyértelmű diszkomfortérzéssel járnak.

A fentiek alapján, gyakorlati jelentőségük okán a véralvadás gátlószereinek részletesebb tárgyalását tekintjük indokoltnak, és kevésbé fókuszálunk a vérzések gátlószereire. Az ATC besorolás szerint a trombózis kezelésére használt szereknél (B01)

- a B01AA kód jelöli a K-vitamin-antagonistákat,
- a B01AB a heparint és fragmenseit (kivéve a fondaparinuxot, amely B01AX besorolást kapott),
- B01AC a kódja a vérlemezke-aggregáció gátlószereinek,
- B01AD a fibrinolitikus és egyéb enzimek kódja,
- B01AE a trombin közvetlen gátlószereit,
- B01AF a Xa véralvadási faktort közvetlenül gátló szereket, végül
- a B01AX az egyéb vegyületeket jelenti.

A Magyarországon gyógyszerkészítményként forgalomban lévő és/vagy a Ph.Hg. VIII-ban [1] hivata-

A véralvadás-gátlók a gyógyszerek egyik legerjedtebben használt csoportját alkotják. Az egyéb keringési betegségekhez társuló véralvadási rendellenességek az életminőséget jelentősen befolyásolják, potenciális életveszélyt jelentenek, és komoly népegészségügyi tényezőként kell számolni velük. A közlemény, a gyógyszerészi kémiai tárgyú, különböző szerzők által, több év távlatában írt gyógyszerésztovábbképző közleménysorozat részeként (egy közleménypár első tagjaként) a trombózis-ellenes szerek közül a heparinnak és a fragmenseinek a gyógyszerészi kémiáját tárgyalja. A sorozat közleményeinek már megszokott felépítése szerint, a rövid történeti bevezetőt követi a heparin és a kis molekulatömegű heparin-fragmensek (LMWH) szerkezetének ismertetése, fizikai-kémiai, kémiai és spektroszkópiás jellemzésük. Ezután következik a heparin bioszintézisének, és ipari előállításának, valamint kis molekulatömegű heparinokká történő átalakításának a tárgyalása. A továbbiakban a hatásmechanizmust követően a közleményt az analitika, valamint az alkalmazásaik és a mellékhatásaik ismertetése zárja.

los, nem fehérje típusú véralvadásgátló és vérzéscsillapító hatóanyagokat foglalja össze az **I. táblázat**. Tekintettel arra, hogy a trombózis elleni szereknek több olyan csoportja van, amely kémiai szempontból is érdeklődésre tarthat számot, a vegyületek tárgyalását két részre osztottuk: a heparin és származékai szerteágazó fizikai-kémiai, biokémiai és biológiai sajátosságai alapján úgy ítéltük meg, hogy jelen közleményt teljes egészében ezek tárgyalására szánjuk, a többi szerről pedig a soron következő közleményben ejtünk szót.

A véralvadás biológiája

A véralvadás bonyolult proteolitikus enzim kaszkádreakciók, plazmafehérje-sejt és sejt-sejt kölcsönhatások révén valósul meg, és alapvetően három fő komponense van [3-5]:

1. A helyi érfal-összehúzódás, amit a sérült érfal sejtjeiből, az ereken található idegvégződésekből, és a vérlemezkékből felszabaduló érszűkítő hatású anyagok, pl. szerotonin, tromboxán-A₂, adrenalin, noradrenalin stb. váltanak ki.
2. A vérlemezkék összetapadása, aggregátum-képzése.

3. A véralvadás proteolitikus kaszkádreakcióinak következtében a fibrin fehérjéből kialakuló térháló, amely összeépül a vérlemezkék aggregátumaival.

Az **1. ábra** a véralvadási kaszkád reakciók vázlatát, és a lehetséges közbeavatkozási pontokat szemlélteti. A zöld nyilak az aktivációs folyamatokat, a piros nyilak pedig a fiziológiás körülmények közt is előforduló gátlási mechanizmusokat jelölik. Piros betűvel a természetes gátló anyagokat jelöltük, fehér betűvel és piros háttérrel a direkt gátló hatású gyógyszereket ábrázoltuk. (A heparin és származékai az indirekt mechanizmus miatt – eleve létező fiziológiás gátlás fokozása, ld. a hatásmechanizmusnál – eltérő színnel szerepelnek.) Az egyes részfolyamatokat a szerek hatásmechanizmusának tárgyalásánál részletezzük majd.

A véralvadási kaszkád gátlószerei

A heparin és fragmensei

Történet

1916-ban *Jay McLean*, a baltimore-i John Hopkins Egyetem másodéves orvostanhallgatója, a *William H. Howell* vezette kutatócsoport tagjaként, véralvadási indukáló anyagokat keresett, kutya májszövet mintában – ez a név eredete, (ήπαρ / hepar = máj, ógörögül) – helyette azonban véralvadásgátló hatása volt a kapott kivonatnak, a kísérleti állatokban súlyos vérzést okozott [6, 7]. *Howell* és munkatársai először foszfátid típusú vegyületek keverékének tulajdonították a hatást, később jöttek rá, hogy egy vízdoldékony anyag az

I. táblázat

A magyarországi gyógyszerkészítményekben ill. a Ph.Hg.VIII-ban előforduló nem fehérje szerkezetű gyógyszer-hatóanyagok

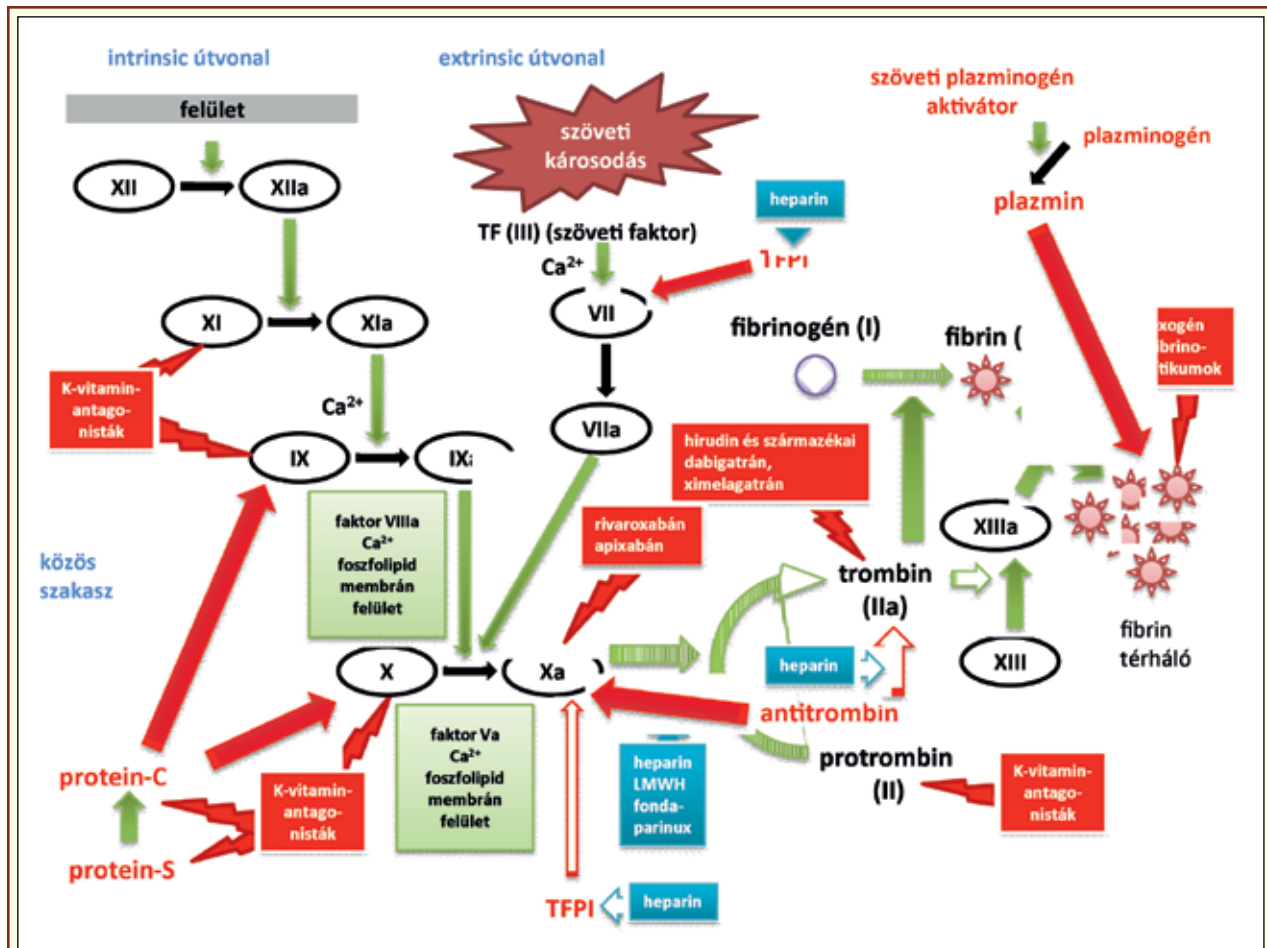
	Készítmény	Ph.Hg. VIII.-ban hivatalos-e?
B01A		
B01AA – K-vitamin-antagonisták		
acenokumarol	SYNCUMAR FORTE tabletta SYNCUMAR MITE tabletta	nem (Ph.HgVII.-ben volt [2])
warfarin	MARFAGEN tabletta MARFARIN tabletta MARFARIN 5 mg tabletta WARFARIN ORION tabletta	igen
B01AB Heparin és fragmensei (fondaparinux: B01AX)		
bemiparin	ZIBOR oldatos injekció előretöltött fecskendőben	nem
dalteparin	FRAGMIN oldatos injekció előretöltött fecskendőben FRAGMIN többadagos oldatos injekció FRAGMIN oldatos injekció	igen
danaparoid	nincs forgalomban	igen
enoxaparin	CLEXANE oldatos injekció előretöltött fecskendőben CLEXANE többadagos oldatos injekció	igen
heparin	HEPARIBENE Ca oldatos injekció HEPARIBENE Na oldatos injekció HEPARIN AL gél LIOTON gél	igen
heparin, kombinációk	CONTRACTUBEX gél DOLOBENE gél	
fondaparinux (b01ax)	ARIXTRA oldatos injekció előretöltött fecskendőben ARIXTRA 2,5 mg/0,5 ml oldatos injekció előretöltött fecskendőben ARIXTRA 5 mg/0,4 ml oldatos injekció előretöltött fecskendőben ARIXTRA 10 mg/0,8 ml oldatos injekció előretöltött fecskendőben ARIXTRA 7,5 mg/0,6 ml oldatos injekció előretöltött fecskendőben	nem
nadroparin	FRAXIPARINE oldatos injekció FRAXIPARINE MULTI többadagos oldatos injekció FRAXODI oldatos injekció	igen
parnaparin	FLUXUM oldatos injekció előretöltött fecskendőben	igen
tinzaparin	nincs forgalomban	igen

B01AC

Adenozin receptor antagonisták

	Készítmény	Ph.Hg. VIII.-ban hivatalos-e?
klopidogréll	CLOPIDOGREL HEXAL filmtabletta CLOPIDOGREL MYLAN filmtabletta CLOPIDOGREL RATIOPHARM filmtabletta CLOPIDOGREL TEVA filmtabletta CLOPIDOGREL ZENTIVA filmtabletta ISCOVER filmtabletta PLAVIX filmtabletta ZYLLT filmtabletta ATROMBIN filmtabletta CLOPIDEP filmtabletta CLOPIDIX filmtabletta CLOPIDOGREL ACCORD filmtabletta CLOPIDOGREL ACTAVIS filmtabletta CLOPIDOGREL ARROW filmtabletta CLOPIDOGREL GENERICS filmtabletta CLOPIDOGREL GSK filmtabletta CLOPIDOGREL JENSON filmtabletta CLOPIDOGREL USV EUROPE filmtabletta CLOPIDOGREL-Q PHARMA filmtabletta CLOPIDOGREL-SPLENDRIS filmtabletta CLOPIGAMMA filmtabletta EGITROMB filmtabletta KAFIDOGREL filmtabletta KARDOGREL filmtabletta KERBERAN filmtabletta LOFRADYK filmtabletta LOPIGALEL filmtabletta NOFARDOM filmtabletta PLAGREL filmtabletta SAROVEX filmtabletta TESSYRON filmtabletta TROGRAN filmtabletta TROMBEX filmtabletta PLAVIX PLUS filmtabletta és gyomornedv-ellenálló tablettá (klopidogréll+acetilszalícilsav) TROMBEX PLUS filmtabletta és gyomornedv-ellenálló tablettá (klopidogréll+acetilszalícilsav)	igen
praszugréll	EFIENT filmtabletta	nem
tiklopidin	ACLOTIN filmtabletta IPATON filmtabletta TICLID filmtabletta	igen
tikagrelor	BRILIQUE filmtabletta	nem
Prosztaclínék		
epoprosztenol	DYNOVAS por és oldószer oldatos infúzióhoz	nem
treprosztinil	REMODULIN oldatos infúzió	nem
iloproszt	ILOMEDIN koncentrátum oldatos infúzióhoz VENTAVIS inhalációs oldat	nem
Egyéb vérlemezke aggregáció gátlószerek		
dipiridamol	ASASANTIN retard kapszula: dipiridamol+acetilszalícilsav	igen
tirofiban	AGGRASTAT koncentrátum oldatos infúzióhoz	nem
B01AE – A trombin közvetlen gátlószerei		
dabigatráll etexilát	PRADAXA kemény kapszula	nem
B01AF – A Xa faktor közvetlen gátlószerei		
rivaroxabán	XARELTO filmtabletta	nem
B02 – Vérzéscsillapítók		
B02A – Antifibrinolitikumok		
B02AA – Aminosavak		

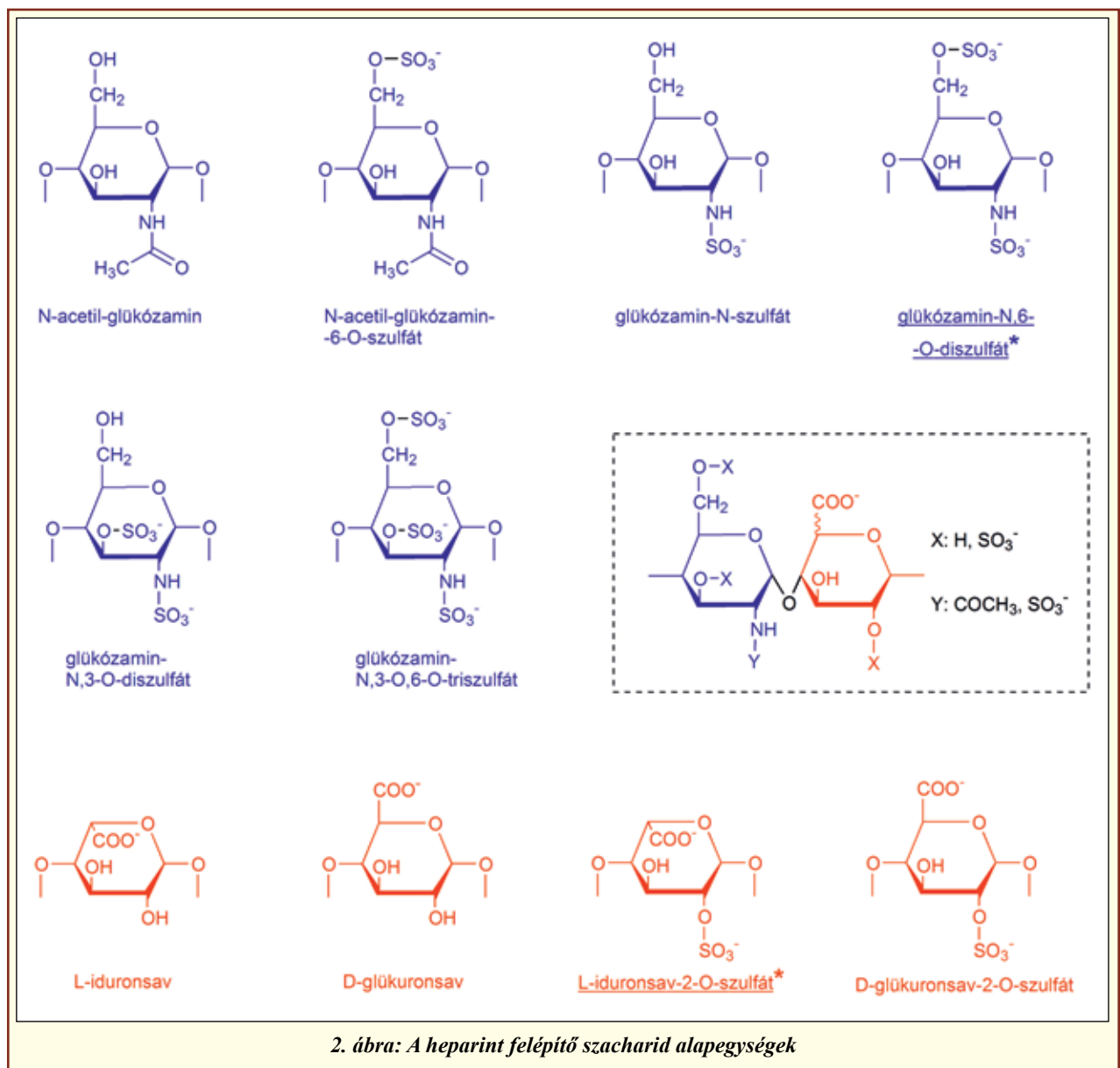
	Készítmény	Ph.Hg. VIII.-ban hivatalos-e?
aminokapronsav	ACEPRAMIN 4 g/10 ml koncentrátum oldatos infúzióhoz ACEPRAMIN granulátum	igen
tranexámsav	EXACYL filmtabletta EXACYL oldatos injekció	igen
B02BX – Egyéb vérzéscsillapítók		
eltrombopág	REVOLADE filmtabletta	nem
etamszilát	DICYNONE oldatos injekció DICYNONE tabletta	igen



1. ábra: A véralvadási kaszkádreakciók és a gyógyszeres beavatkozási lehetőségek

antikoaguláns, és azt is sikerült megállapítaniuk, hogy egy szénhidrátról van szó, amely nem tartalmaz foszfát csoportokat. 1922-ben az Amerikai Élettani Társaság éves összejövetelén tartottak beszámolót a heparin vizes kivonatának előállítására kifejlesztett eljárásukról. A kémiai szerkezet feltárásának további úttörői a svéd *Sune Bergstrom* és *Eric Jorpes* voltak, ők állapították meg, hogy a heparin glükózamint tartalmaz építőegységként, valamint a nagy mértékű szulfatációra is ők jöttek rá. 1946-ban *Melville L. Wolfrom* azonosította a D-glükuronsavat, 1962-ben pedig *Tony Cinfonelli* és *Al Dorfman* az L-iduronsavat, mint alkotóelemeket. A gyártás és a gyógyászati felhasználás

messze megelőzte a vegyület szerkezetének felderítését, már az 1920-as évektől törekedtek biztonságosan alkalmazható heparinkészítmények ipari léptékű előállításának kidolgozására, azonban az 1930-as évek előtt a heparint csak kis tételben és rossz minőségben tudták kinyerni, számos szennyezőt tartalmazott, igen toxikus volt, aminek következtében a klinikumban való alkalmazása nem terjedt el. Stockholmban *Jorpes* eredményeinek köszönhetően a *Vitrum AB* nevű svéd vállalat, Torontóban a *Connaught Laboratories*, *Charles Best* (aki *Frederick Banting*gal együtt 1923-ban Nobel-díjat kapott az inzulin felfedezéséért) és *David Scott* munkája révén, parenterálisan, biztonságosan al-



kalmazható heparinkészítményeket tudott előállítani, amelyek sebészeti alkalmazását az általános gyakorlatba be lehetett vezetni (Gordon Murray; Clarence Crafoord). A kis molekulatömegű heparinok (low-molecular-weight heparin: LMWH), az alapvegyülethez képest fél évszázaddal később, az 1980-as években kerültek be az orvosi alkalmazásba.

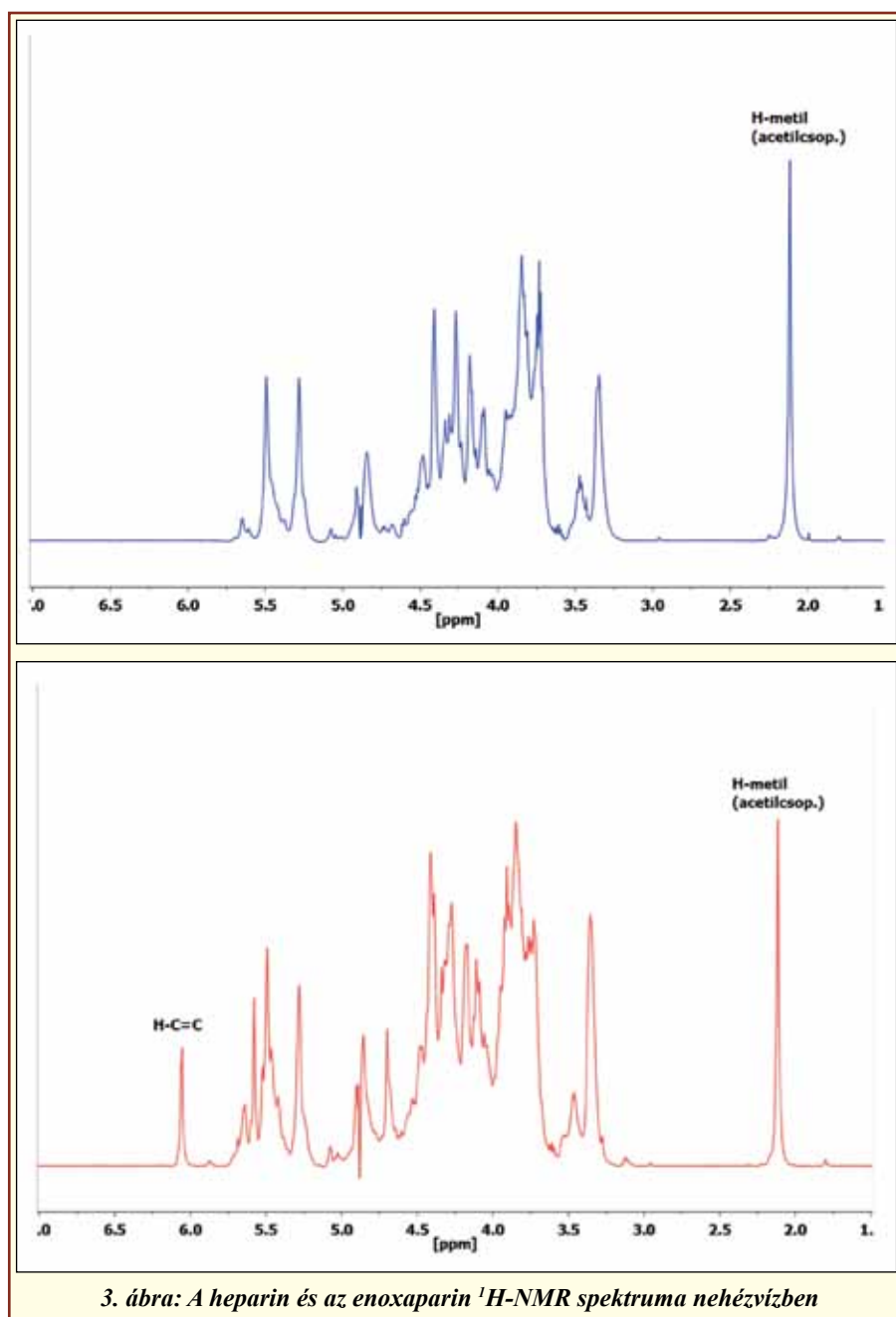
Szerkezet, térszerkezet

A heparin az emberi és állati szervezetben képződő, savi karakterű (sav funkciós csoportokat tartalmazó) poliszacharidok különböző méretű szénhidrát-láncokból felépülő (polidiszperz) keveréke [8-10]. Az utólagosan nem fragmentált és nem frakcionált heparinok molekulatömege általában 5000 - 25000 Da között változhat. A heparin az ún. glükózamino-glikánok (mukopoliszacharidok) közé tartozik (ide tartozik még a heparán-szulfát, a dermatán-szulfát, a keratán-szulfát, a kondroitin-szulfát I és II és a hialuronsav), ame-

lyek közös jellemzője, hogy az elágazás nélküli szénhidrátláncukat egy amino-cukor és egy uronsav szubsztituált (szulfatált vagy acetilezett) származékaiból álló diszacharid egységek építik fel [8-10]. A cukor-egységek közt 1,3-, ill. 1,4-glikozidos kötések lehetnek, a heparinban kizárólag 1,4-glikozidos kötések fordulnak elő. A heparint felépítő monomerek, valamint a dimer alapegységek általános szerkezetét szemlélteti a **2. ábra**.

Fizikai-kémiai tulajdonságok és reaktivitás

A heparin és fragmensei fehér, vagy halványsárga, higroszkópos porok [1,11-13], vízben kitűnően oldódnak, mivel az erős sav szulfát csoportok gyakorlatilag 100%-ban protonátlan formában vannak, ami miatt permanens polianion szerkezetűnek tekinthetők a molekulák. Hozzájárul még a jó vízdékonysághoz a polialkohol (cukor) karakterük is. A fentiekből következően, szerves oldószerekben gyakorlatilag nem ol-



3. ábra: A heparin és az enoxaparin ^1H -NMR spektruma nehézvízben

dódnak, még a viszonylag poláris metanolban, etanolban vagy acetonban sem [1, 11-13]. A karboxilcsoportok a közeg pH-jától függő mértékben ionizáltak, a Ph.Hg. VIII. mind a heparin nátrium ill. kalcium sója, mind a kis molekulatömegű heparin fragmensek esetében igen széles, pH = 5,5-8,0 közötti tartományt enged meg a vizes oldat kémhatására. Kémiai stabilitásuk – különösen a biológiai eredetű készítmények körében – kifejezetten jónak mondható, szobahőmérsékleten, sőt 37 °C-on is, száraz állapotban évekig eltarthatók [11, 13], oldatban pH = 4-9 között stabilak, az injekciók az autoklavozást akár 10 percig is kibírják, bár a sterilizálásukra inkább a szűrés javasolt.

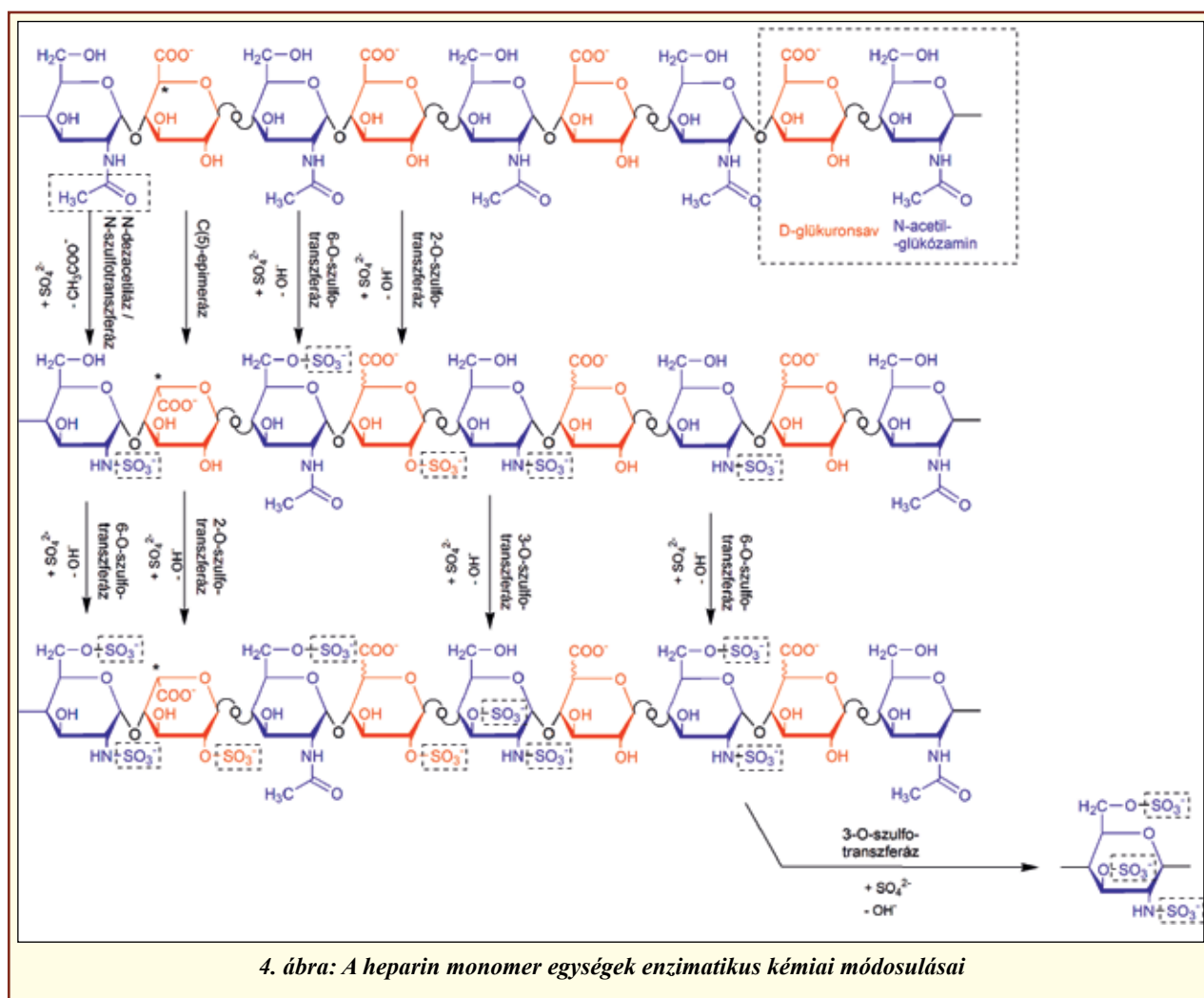
Spektrális tulajdonságok

Az infravörös spektrumukat a Ph.Hg. VIII. nem alkal-

mazza az azonosításukra, az UV/VIS spektrumuk is jellegtelen, csak az eliminációval előállított kis molekulatömegű heparinoknál van analitikai jelentőséggel bíró fényelnyelés, habár kvantitatív célokra ott sem használatos (ld. az előállításnál). Gyakorlati szempontból kiemelkedően fontos viszont az NMR spektroszkópia a heparinok analitikájában. A 3. ábra mutatja a heparin nátrium sójának (kézzel) és az enoxaparin (pirossal) nátrium sójának proton NMR spektrumát. A heparinok szerkezetéből adódóan az aromás tartományban nem várhatóak jelek, a legtöbb proton jele 3-6 ppm közt jelentkezik, egymástól az ID spektrumon nem lehet őket elkülöníteni, azonban az N-acetil-glükózamin egységekben található acetilcsoportok metil protonjai jól elkülönülő szinguletet adnak kb. 2,1 ppm-nél, mindkét származéknál. Jól észlelhető különbség az enoxaparin spektrumában 6,1 ppm környékén látható jel, ez az eliminációs előállítás révén keletkező kettős kötés C4 szénatomjához tartozó olefin proton jele, amely a heparin spektrumából hiányzik.

Előállítás

A heparin a szervezetben a hízósejtekben, májban, tüdőben, bőrben fordul elő, egy kizárólag glicin és szerin aminosavakat tartalmazó hordozófehérjén szintetizálódik [10], a heparinláncok végei a szerin aminosavak hidroxilcsoportjaival O-glikozidot képeznek, az egész proteoglikán szerkezet, a fehérjegerinre merőlegesen, párhuzamosan felsorakozó cukorláncokkal, madártollra emlékeztető alakot vesz fel. A polimerizáció eredménye egy váltakozva N-acetil-glükózamin és D-glükuronsav egységekből felépülő lánc, amelyen további kémiai enzimatis módosítások történnek [8-10]. Ezek is a hordozófehérjéhez kötött heparinon mennek végbe, ezután a szénhidrátlánc különböző enzimek hatására, random módon hasad el, ez az oka a polidiszperzitásnak. A legfontosabb reakciók (4. ábra) az N-dezacetileződést követő N-szulfatálás a glükózamin egységeken, valamint az ezt követő 6- ill.



3-O-szulfatáció, a D-glükuronsav egységeken pedig a 2-O-szulfatálás, és a C5 szénatom epimerizációja, amely L-iduronsavat eredményez. Ez utóbbi reakció kb. 90%-ban megy végbe, így a heparinban végül alig 10% D-glükuronsav (származék) marad [10]. A gyógyászati célú, nagy molekulatömegű heparint állatok – döntően sertés – emésztőszervi nyálkahártyájából vonják ki [14]: az alapanyagot több órán keresztül, először szobahőmérsékleten, majd 60-70 °C hőmérsékle-

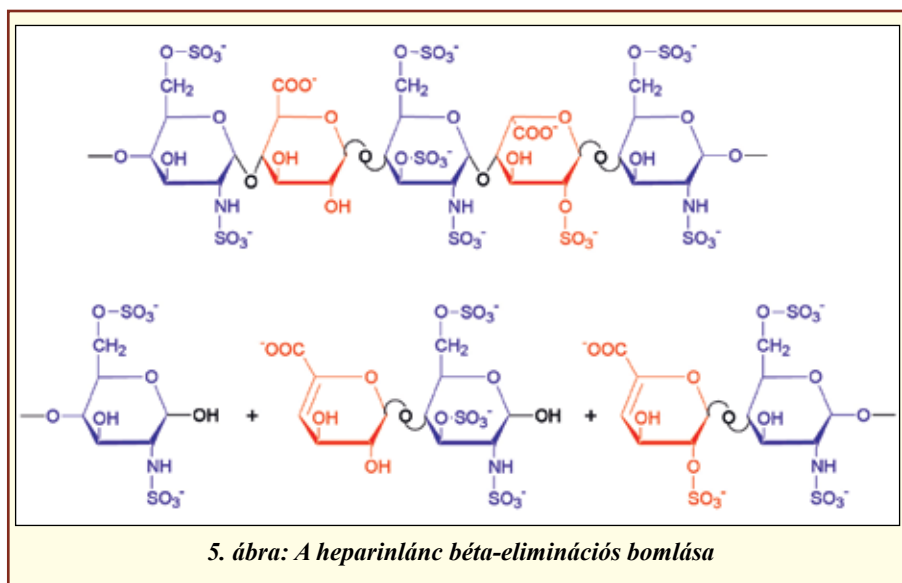
ten emésztik fehérjebontó enzimekkel, semleges vagy gyengén lúgos közegben (pH = 7-9), anioncserélő gyanta jelenlétében. Ezután hosszabb ideig hagyják lehűlni, majd a gyantát kiszűrik és lemossák a gyantán feldúsult heparint.

A kis molekulatömegű heparinokat, a heparin további, *in vitro* kémiai vagy enzimatisus lebontásával állítják elő [8, 9, 15]. A különböző vegyületeket és előállításuk módját, valamint az ebből adódó esetleges

II. táblázat

Néhány fontosabb kis molekulatömegű heparin (LMWH)

Név	Molekulatömeg	Előállítás	Ph.Hg.VIII. szennyezésvizsgálat
bemiparin	átlagosan 3600	lúgos béta-eliminációval	nem hivatalos a Ph.Hg.VIII.-ban
dalteparin	5600–6400	dezaminatív hasítás	1. nitrit (ioncserés kromatográfia) 2. bór (ICP-AES)
enoxaparin	3800–5000	benzilésztérből, lúgos béta-eliminációval	1. UV-abszorbancia 2. benzil-alkohol (fordított fázisú HPLC)
nadroparin	3600–5000	dezaminatív hasítás	nitrozamin-csoportok (kemilumineszcenciával)
parnaparin	4000–6000	hidrogén-peroxidos hasítás	katalizátor szennyezés (Cu ²⁺) (atomabszorpciós spektroszkópiával)
tinzaparin	5500–7500	enzimatisus béta-elimináció	UV-abszorbancia



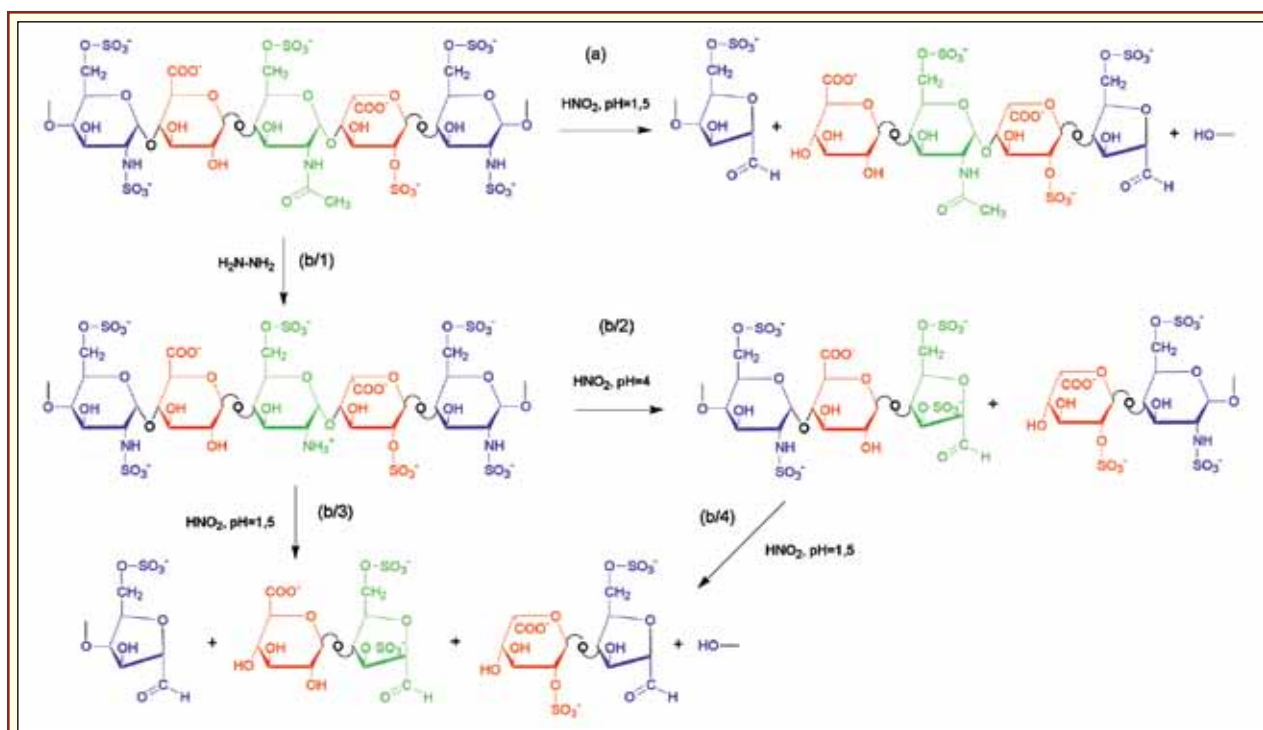
Ph.Hg. VIII. szennyezésvizsgálatokat [1] a **II. táblázat** foglalja össze.

Az enzimatis lebonítás nem hidrolízissel (hidroláz enzimekkel), hanem eliminációs reakcióval, liáz enzimekkel (heparináz I-III) történik. A reakció lényege, hogy az uronsav egységek C4-szénatomjáról a mellette lévő, glikozidos kötést létesítő aminocukor, az oxigénnel együtt távozik, β -elimináció révén (**5. ábra**). Ez mintegy ellentétje az α,β -telítetlen oxovegyületek jól ismert konjugált nukleofil addíciójának.

A fenti reakció enzim közreműködése nélkül is végbemehet, lúgos közegben, azonban ilyenkor a karbonsav csoportból előtte benzil-észtert kell készíteni. A kialakuló konjugált kettős kötéses rendszer a mole-

gyűrű-izomerizációval egy öttagú gyűrűbe záródik, míg az eredeti, félacetalos gyűrűt alkotó aldehidcsoport szabaddá válik, a lánc pedig felhasad. Ebben az esetben az N-acetil-glükózamin egységek mellett nincsen fragmentálódás (**6. ábra a**).

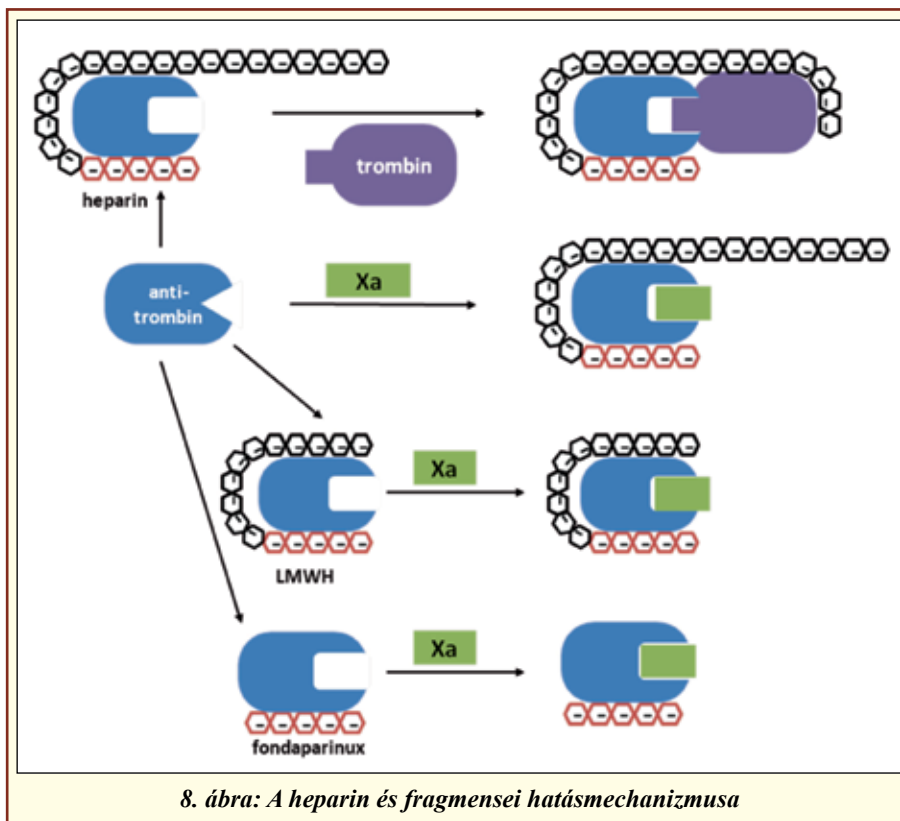
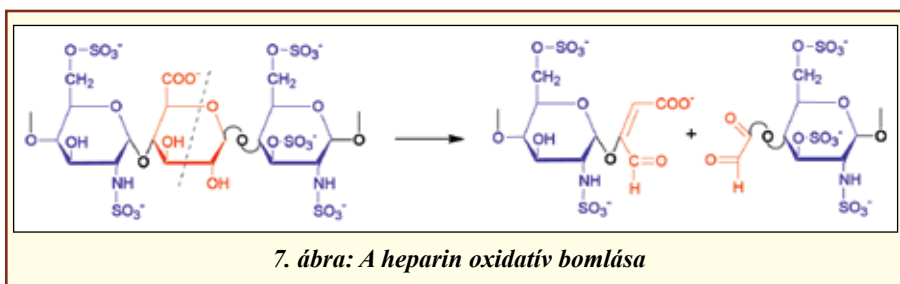
A heparin hidrazinos előkezelése hatására (**6. ábra b/1**), az N-acetil-glükózaminok nitrogénje szabaddá válik, így azok is érzékennyé válnak a nitrites elbontásra. A nitritet enyhébb körülmények közt, pH = 4-es közegben adva a heparinhoz, a glükózamin N-szulfát csoportok érintetlenek maradnak, és csak a glükózaminoknál történik lánchasadás (**6. ábra b/2**). Amennyiben a pH-t 1,5-re állítjuk, akkor a glükózamin-N-szulfátoknál is elbomlik a molekula (**6. ábra b/3,4**). A



6. ábra: A heparin redukív dezaminálással végbemenő bontásának útvonalai

kula UV spektrumát szignifikánsan megváltoztatja, elnyelési maximumát 232 nm-ig tolja el.

A kémiai átalakítások másik csoportját a nitrites (sáltromossavas vagy izoamil-nitrites) redukív dezaminálás alkotják. Ha a reakciót az N-acetil-glükózaminok előzetes dezacetilezése nélkül, de erősebb körülmények közt, pH = 1,5 kémhatáson hajtják végre, akkor a glükózamin-N-szulfát egységeknél történik bomlás, a nitrogénatom távozik, a végeredmény egy alkoholos hidroxilcsoport, amely



nitrites fragmentációval előállított LMWH molekulákból, a gyógyászati felhasználásra szánt készítményeknél a láncvégi aldehidcsoportokat alkohollá redukálják, általában nátrium-tetrahidrido-borát(III) segítségével. Kísérleti mintáknál ez egyszerűen lehetővé teszi a minták izotópos jelölését is, ha trícium Na[BH₄] reagenst használnak, akkor a molekulába trícium épül be. További depolimerizációs módszer az oxidatív hasítás, hidrogén-peroxiddal, Cu²⁺ katalizátor jelenlétében, ez esetben nem a glikozidos kötéseknek bomlik a biopolimer, hanem az uronsav gyűrűk hasadnak fel (7. ábra).

Hatásmechanizmus, SAR

A heparin és fragmensei, indirekt hatású antikoagulánsok, az antitrombinhoz kötődve, azt a biológiailag aktív konformációban stabilizálják, így az kötődni tud a trombinhoz és a Xa faktorhoz [5]. Az antitrombin egy májban képződő, egyetlen, 432 aminosav hosszúságú láncból felépülő peptid, a véralvadási kaszkád proteáz enzimjeinek természetes gátlószere. A heparin-antitrombin kölcsönhatásért egy jól meghatározott, öt szénhidráttól álló szekvencia a felelős, amely jelen van az összes hatásos heparin-származékban (a 8. ábrán pirossal jelölve) ez egyben, egy metilcsoportot leszámítva, azonos a fondaparinux szerkezetével (9. ábra), amely a legkisebb molekulájú hatékony heparin-származék. A Xa faktor gátlásához elegendő az antitrombin aktivált formájának bekötődése, míg a trombin-gátláshoz szükség van az antitrombinnal képzett komplex további stabilizálására is, amely során a nem frakcionált heparin hosszú szénhidrátlán-

cának az elsődleges kötő szekvenciától távol eső vége a trombinhoz kapcsolódik, mintegy „biztonsági övként” rögzíti azt. Az LMWH-k és a fondaparinux esetében ez a másodlagos kötődés nem valósulhat meg, ezért ezek nem hatnak a trombin-aktivitásra. Ezen felül a nem frakcionált heparinok a szervezetben lévő másik természetes antikoaguláns, a TFPI [tissue factor pathway inhibitor (szöveti faktor út inhibitor)] vérszintjét is emelik. A TFPI az aktivált X-es faktort, valamint a szöveti faktor/VII-es faktor komplexet gátolja.

Analitika

A heparinok analitikájában mind a gyógyszerkönyvi, mind egyéb analitikai vonatkozásban, a döntő szerep a modern nagyműszeres technikáknak (NMR, MS), az ioncserés és méretkizárásos kromatográfiának, valamint a biológiai módszereknek jut [1, 8, 9]. A kis molekulatömegű heparinokra a Ph.Hg. VIII.-ban található egy közös cikkely, *Heparina massae molecularis minoris* néven, ezen kívül a különféle LMWH heparin típusokra az egyes cikkelyek csak az eltéréseket, és a típusfüggő kiegészítő vizsgálatokat tartalmazzák.

A nagy molekulájú (frakcionálatlan) heparinra két külön cikkely van a nátrium, ill. a kalcium sóra (*Heparinum natricum* ill. *Heparinum calcicum*).

A heparinok Ph.Hg. VIII. analitikájának rövid összefoglalása:

1. Az ioncserés kromatográfia a heparin esetében az azonosításnál és a szennyezésvizsgálatnál egyaránt szerepet kap, anioncserélő gyanta oszlopon végezteti a Ph.Hg. VIII., gradiens elúcióval, az eluens perklorát-ion koncentrációját – ezáltal az elúciós erejét – növelik folyamatosan.
4. A méretkizárásos kromatográfiát a kis molekulatömegű heparinoknál alkalmazzák azonosításként, olyan szilikagél állófázissal, amely a 15-100 kDa molekulatömegű fehérjék frakcionálására optimális.
5. Az NMR spektroszkópia minden heparinkészítménynél kiemelt azonosítási módszer, nehézzvízes oldatban, CRS anyagokkal kell összevetni a minta spektrumát.
6. A biológiai módszerek a tartalmi meghatározás kizárólagos eszközei a heparinoknál, egyben az azonosítás egy pontját is jelentik az adott heparinféleségre. A *Heparinum natricum* esetében a vizsgálat speciálisan előkezelt birka vérplazma reagens alvadási idejének megnyújtásán alapul, amelynél a vizsgálati minta hígítási sorozatának a hatását standard heparin hígítási sorozatával vetik össze. A kis molekulatömegű heparinok esetében az antitrombin III jelenlétében vizsgálják a trombinra (IIa) ill. a Xa faktorra kifejtett gátló hatásukat, az egyben az azonosság feltétele is, hogy az anti-Xa aktivitás legalább másfélszerese legyen a trombin-gátló aktivitásnak. Az aktivitás mérések alapja, hogy olyan Xa ill. trombin szubsztrátot adnak az oldathoz, amelynek a proteolitikus hasítása színes terméket képez (kromogén szubsztrát), adott idő után leállítva a reakciót, megméri az abszorbanciát, ami az enzimaktivitás gátlásával arányosan csökken.
7. Néhány további vizsgálat a heparinok körében, a teljesség igénye nélkül:
 - *Vizsgálat nukleinsavakra:* vizes oldatban, a nukleotidbázisok 260-265 nm hullámhossz tartományban mutatnak UV aktivitást, ami jelentősen magasabb hullámhossz, mint akár az eliminációval előállított heparinféleségek 231 nm-es abszorpciós maximuma. (megj.: A nukleinsavak, mint potenciális szennyezők, az előállítás forrásából és módjából adódnak, mivel a pH = 7-9 tartományban a negatív töltésű (dezoxi)ribóz-foszfátészter polimer láncok könnyen kötődhetnek az anioncserélőre).
 - *Vizsgálat fehérjékre:* a tirozin csoportok redukáló hatásán alapul, a foszfo-wolfrámsavat wolfrámkékké redukálják (megj.: A teszt eredménye erősen függ a fehérje tirozin tartalmától, ha az

kicsi, akkor viszonylag nagy fehérjeszennyezés is adhat hamis negatív (megfelelt minősítésű) eredményt).

- *Össz-nitrogén tartalom:* kénsavas roncsolás után, átlúgosítják a mintát, és a keletkező ammóniát kvantitatíve ismert mennyiségű sósav mérőoldatba desztillálják kvantitatív módon, majd az el nem reagált sósavat nátrium-hidroxid mérőoldattal visszamérik.
- *Bakteriális endotoxinok:* Az atlanti törzfarkú rák (*Limulus polyphemus*) véréből kinyert LAL-reagens megalvasztásán alapuló, széles körben alkalmazott módszerrel.
- *Nátrium:* atomabszorpciós spektroszkópiával.
- *Előállítás specifikus szennyezések:* nitrit/nitrózaminok, réz, bór, benzil-alkohol (ld. **II. táblázat**).
- *Szulfát/karboxilát arány:* A kis molekulatömegű heparinoknál, teljes egyéb só mentesítés után kell elvégezni, a minta oldatát kationcserélő oszlopon engedik át, az átfolyó mintát gyűjtik, majd NaOH-dal titrálják, konduktometriás végpontjelzés mellett. A titrálási görbéből leolvasható a szulfát csoportokkal ekvivalens, valamint a szulfát és karboxilát csoportok összességével ekvivalens NaOH mennyiség.

Alkalmazás, mellékhatások

Mivel a heparinnak és fragmenseinek a hatása gyorsan beáll, és hamar lecseng, elsősorban az akut esetekben: szívinfarktus, tüdőembólia, mélyvénás trombózis kezelésében használatosak - és nélkülözhetetlenek. Megelőzés céljából, lokálisan alkalmazzák traumatológiai eseteknél (törések, nagyon súlyos zúzódások), a rögzépződés megakadályozására. A kis molekulatömegű heparin fragmensek (a fondaparinuxot is beleértve) alkalmazása jóval biztonságosabb, mint a frakcionálatlan hepariné, és nem igényelnek klinikai monitorozást, ezért a betegek ambuláns ill. otthoni kezelésében is használhatók. Mivel nagyon polárisak, per os nem szívódnak fel, csak injekcióban vagy infúzióban alkalmazhatók. A placentán a K-vitamin-antagonistákkal szemben nem jutnak át, így terhességben is alkalmazhatók. A mellékhatások tekintetében, a túlada-golásból vagy egyéni véralvadékonyság-eltérésekből adódó vérzéseken kívül, a nem frakcionált heparin nagy dózisban a vérlemezke-aggregációt is gátolja. Trombocitopéniát valamennyi heparin-származék okozhat, amelynek folyamányaként bőrvérzések, sőt paradox módon vérrög-képződés is felléphet [5,16]. A fentieken túl, a heparin – különösen, ha nem megfelelő tisztaságú – allergiás reakciót is kiválthat. A heparin túlada-golás specifikusnak mondható antidótumai a protamin fehérjék. Ezek nagy arginintartalmú fehérjék, amelyek az arginin guanidino-csoportok erős bázicitása miatt (pKa~12-13), fiziológias körülmények között permanens polikationként vannak jelen.

A polikation jelleg felelős a heparin szulfát csoportjaival való kölcsönhatásért, az inaktív komplex képződéséért, ami az antidótum hatás alapja. Gyakorlati szempontból a halakban előforduló protaminok a legjelentősebbek: szalmin (lazac, *Salmo* gen.), klupein (hering, *Clupea* gen.), tinnin (tonhal, *Thunnus* gen.). A Ph.Hg. VIII.-ban szulfát sóként, *Protamini sulfas* néven, lazac ill. hering eredetű protaminok keveréke hivatalos.

IRODALOM

1. Ph.Hg.VIII. (Ph.Eur.) – 2. Ph.Hg. VII. (1987) Szerk: Végh A. – 3. *Rhoades, R.A., Tanner, G.A.*: Medical Physiology, 2nd ed. 2003, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia PA, London) Part IV. Blood and Cardiovascular Physiology, Ch.11., Components, Immunity and Hemostasis (English D), 206-208 old. – 4. *Pallister, C.J., Watson, M.S.*: 2010, UK, Scion Publishing, pp. 336-347 old. – 5. *Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C.*: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed. McGraw-Hill Companies, Inc. 2010. – 6. *Linhardt, R.J., Claude S. Hudson Award*: J. Med. Chem., 46(13), 2551-2564 (2003). – 7. *Wardrop, D., Keeling, D.*: Brit. J. Haematol., 141, 757-763 (2008). – 8. *Rabenstein, D.L.*: Nat. Prod. Rep., 19, 312-331 (2002). – 9. *Jones, C.J., Beni, Sz., Limtiaco, J.F.K., Langeslay, D.J., Larive, C.K.*: Heparin Characterization: Challenges and Solutions, Annu. Rev. Anal. Chem. 4, 439-465 (2011). – 10. *Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.*: Harper's Illustrated Biochemistry. 2003, McGraw-Hill. – 11. Sigma-Aldrich Product Information: HEPARIN SODIUM from Porcine Intestinal Mucosa – 12. The Merck Index, 13th ed., 2001. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, New Jersey, USA. – 13. *Nachtmann, F., Atzl, G., Roth, W.D.*: Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 12. (Academic Press, 1983), K. Florey, ed., 215-276. old. – 14. Van Houdenhoven, F.E.A.: (2001) US Patent, US6232093 B1: Process for the production of heparin. – 15. *Linhardt, R.J., Gunay, N.S.*: Semin. Thromb. Haemost., 25(suppl.3), 5-16 (1999). – 16. *Arepally, G.M., Ortel, T.L.*: N. Engl. J. Med., 355(8), 809-817 (2006).

angol

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Budapest, Högyes Endre u. 9. – 1092
