



Республика Таджикистан

(19) **Т** (11) **226**

(51) **6 A61K 35/14, 35/16, A61L 17/00**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

(21) 96000398

(22) 12.08.96

(46) 30.08.99, Бюл.№2 (14)

(71) Министерство здравоохранения Республики Таджикистан (ТД)

(72) Ахмедов А.А., Мусоев С.М., Исупов С.Д.(ТД)

(73) Министерство здравоохранения Республики Таджикистан (ТД)

(56) Исхаки Ю.Б. Опыт применения препарата яда змеи гюрзы (гюрзотоксина) для остановки кровотечения при некоторых ЛОР-операциях. Дисс...канд.мед.наук, Душанбе, 1958, с.13.

(54) ГЕМОСТАТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО "ГЮРЗОТОКСИН"

(57) Изобретение относится к фармакологии и может быть использовано для остановки кровотечений в хирургической практике. С целью увеличения срока годности, снижения токсичности гемостатического средства и ускорения времени остановки кровотечения, оно содержит яд гюрзы, хлорид натрия, новокаин, дистиллированную воду и стабилизатор, причем в качестве стабилизатора оно содержит бентонит при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Яд гюрзы	0,019-1,05
Хлорид натрия	0,855 - 0,945
Новокаин	0,38 -0,42
Бентонит	2,85 - 3,15
Вода дистиллированная	остальное

Настоящее изобретение относится к фармакологии и может быть использовано для остановки кровотечений в хирургической практике.

Известно гемостатическое средство "Желпластан ", содержащее желатину, плазму крови и антибиотик, причем в качестве антибиотика оно содержит канамицин сульфат при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Плазма животной крови	2,72- 14,29
Канамицин сульфат	0,90 - 4,76
Вода дистиллированная	6,00 -33,33
Желатина	остальное

Однако, известное гемостатическое средство медленно останавливает кровотечение.

Наиболее близким по технической сущности к заявляемому изобретению является выбранное в качестве прототипа гемостатическое средство, содержащее яд гюрзы (1,0 г),

хлорид натрия (20,0 г), новокаин (45,0 г), хлороформ (200 мл), дистиллированную воду до 5 л.

У прототипа и заявляемого изобретения имеются следующие сходные существенные признаки: яд гюрзы, хлорид натрия, новокаин, дистиллированная вода. Новокаин, хлорид натрия относится к индифферентным веществам.

Яд гюрзы относится к гемостатическим препаратам природного происхождения, обладающим протромбиновым действием. Свёртывание крови наступает под влиянием яда на физико-химические стороны процесса гемокоагуляции. Свёртывающее действие змеиных ядов обусловлено наличием в них протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессе свёртывания крови вообще.

Яд гюрзы является более эффективным гемокоагулянтом, чем яд эфы, он обладает хорошо выраженным кровоостанавливающим действием и является стимулятором регенерации тканей. Недостатком прототипа является ограниченность срока годности до двух недель, а также применение при стерилизации ядовитого вещества хлороформа, присутствие которого отрицательно влияет на организм и на токсические свойства змеиных ядов.

Целью изобретения: увеличение срока годности гемостатического средства, снижение его токсичности, а также ускорение времени остановки кровотечения.

Для достижения поставленной цели гемостатическое средство "Гюрзотоксин" содержит следующий состав: яд гюрзы, новокаин, хлорид натрия, дистиллированную воду и стабилизатор, причем в качестве стабилизатора оно содержит бентонит при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Яд гюрзы	0,019-0,021
Хлорид натрия	0,855 - 0,945
Новокаин	0,38 -0,42
Бентонит	2,85 -3,15
Вода дистиллированная	остальное

Бентонит это тонкодисперсная глина, состоящая не менее, чем на 60-70% из минералов группы монтмориллонита ($Al_2O_3 \times 4 H_2O \times 2H_2O$), обладающая связующей способностью, адсорбционной и каталитической активностью и проявляющая упруго-пластично-вязкие свойства даже в разбавленных суспензиях.

Порошок бентонита, применяемый в качестве стабилизатора, в водном растворе хлорида натрия яда гюрзы и новокаина, образует суспензию и сорбирует на своей поверхности частицы компонентов средства, т.е. происходит поверхностная сорбция.

Полученная суспензия, в отличие от препарата в хлороформе, дольше сохраняет свои гемостатические свойства, более длительно воздействует на пораженный участок, не влияет на токсические свойства змеиных ядов и не оказывает побочного действия на организм.

Экспериментально, для разработки оптимального состава средства, было подготовлено четыре различных соотношения ингредиентов, приведенных в таблице 1.

Растворы готовились следующим образом:

1. В 500 мл дистиллированной воды добавляли 4,5 г порошка натрия хлорида и 2,0 г порошка новокаина и 0,02 г яда гюрзы. Всё смешивали до полного растворения.

2. В 200 мл дистиллированной воды добавляли 15,0 г порошка бентонита и оставляли на 1 -1,5 ч для набухания. В оставшихся 300 мл дистиллированной воды растворяли 4,5 г порошка натрия хлорида и 2,0 г порошка новокаина и к ним добавляли 200 мл суспензии бентонита, смешивали в течение 10-15 минут. В полученной суспензии растворяли 0,02 г яда гюрзы.

3. В 500 мл дистиллированной воды растворяли 4,5 г порошка натрия хлорида, 2 г порошка новокаина и 15,0 г каолинита, смешивали в течение 10 -15 мин. Затем в полученной суспензии растворяли 0,02 г яда гюрзы.

4. В 500 мл дистиллированной воды растворяли 4,5 г новокаина и 2 г порошка натрия хлорида, затем добавляли 8,1 мл 10% раствора хлорида кальция и 0,02 г яда гюрзы. Смешивали в течение 10-15 минут.

Оптимальный состав определялся по времени свёртываемости крови и времени рекальцификации плазмы крови лабораторных животных под действием вышеуказанных растворов средства.

Для определения времени свёртываемости крови, из ушной вены подопытных животных брали 10 капель на часовое стекло, помещали его во влажную камеру, которую готовили прокладыванием чашки Петри марлей, смоченной водой. Концом запаянной пастеровской пипетки проводили по поверхности капли крови. Появление нитей фибрина считали началом свёртывания крови, а образование сгустка — завершением этого процесса. В норме начало свёртывания наблюдается через 5-8 минут, а конец - через 15-18 минут. Влияние испытываемых растворов, изготовленных на основе яда гюрзы, устанавливали путем внесения двух капель исследуемого раствора в концентрации 1:5000 на каплю крови сразу же после её взятия. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Данные таблицы показывают, что под влиянием исследуемых растворов, изготовленных на основе яда гюрзы в концентрации 1:5000, сокращается время свёртывания крови от 73,7 до 88,6% по сравнению с контролем. Этот процесс наиболее выражен при использовании растворов № 2 и 4.

Для определения времени рекальцификации плазмы крови в цитратную плазму с тромбоцитами (кролики, крысы) добавляли по 0,01 мл растворов № 1 - 4 в концентрации 1:5000.

В аглютинационную пробирку отмеряли 0,1 мл раствора хлорида кальция, 0,1 мл физиологического раствора. Пробирку помещали в водяную баню при температуре, равной 37°C. Через 60 сек. добавляли 0,1 мл оксалатной или цитратной плазмы. Секундомером отмечали время свёртывания плазмы. Оксалатная плазма здорового человека при добавлении оптимального количества CaCl_2 свёртывается в течение

60- 120 сек.

Влияние исследуемых растворов на время рекальцификации плазмы крови проверяли следующим образом. В пробирку, содержащую раствор хлористого кальция, физраствор и нитратную плазму, добавляли 2 или 4 капли испытуемого раствора (0,1 или 0,02 м), смешивали и измеряли время рекальцификации плазмы. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Данные таблицы показывают, что под влиянием исследуемых растворов, изготовленных на основе яда гюрзы, сокращается время рекальцификации плазмы крови животных по сравнению с контролем от 48,5 до 68,3%. Как видно из таблицы 2, этот процесс наиболее выражен при использовании раствора № 2 как в плазме крови крыс, так и в плазме крови кроликов.

Результаты, приведенные в таблице 2, показывают, что среди исследуемых растворов, изготовленных на основе яда гюрзы, оптимальным составом явился состав № 2, который и стал объектом исследований с условным названием "Гюрзотоксин".

Интервалы значений, указанные в формуле изобретения, являются оптимальными для достижения поставленной цели, так как если они выходят за указанные в формуле интервалы, то цель изобретения не достигается.

Гемостатическое средство "Гюрзотоксин" готовят следующим образом:

Для получения раствора в одну загрузку берут яд гюрзы среднеазиатской в количестве 1 г и растворяют в 1 л дистиллированной воды, тщательно перемешивая. К полученному раствору при постепенном перемешивании последовательно, весообъемным методом, добавляют 1 л 15% суспензии бентонита, 1 л 2% раствора новокаина и 1 л 4,5% раствора хлорида натрия. Полученный объем доводят дистиллированной водой до 5 литров.

Известно, что змеиные яды являются термолабильными веществами и при термической стерилизации легко теряют свою активность. Поэтому стерилизацию проводят с помощью мембранных фильтров, задерживающих микроорганизмы и их споры. Такими мембранными фильтрами явились фильтры "Владипор", разработанные ВНИИ синтетических смол, выпускаемые на основе целлюлозы ацетата и характеризующиеся безвредностью и устойчивостью при работе с растворами, имеющими значение pH от 1,0 до 10,0.

Проверку стерильности препарата проводят по методике государственной Фармокопеи СССР XI издания.

После приготовления и фильтрации средство помещают в стерильные пенициллиновые флаконы из нейтрального стекла марки НС и хранят сериями при температуре, равной 4°C.

Полученное средство представляет собой слегка опалесцирующую жидкость с сероватым осадком на дне. Анализ физико-химических свойств раствора показал, что он имеет: плотность 1,235 (по ГФХ, стр.772), вязкость 0,0531 (по Оствальду), pH, равную 6,5 - 7,1 (потенциометрически).

Качественный анализ яда гюрзы в лекарственной форме проводят реакцией преципитации. Реакцию проводят в пробирках для аглютинации диаметром 5-6 мм и высотой 10 см. Пробирки предварительно промывают и стерилизуют.

100 г агара расплавляют на водяной бане и добавляют в качестве консерванта 0,25 г трикрезола, охлаждают до температуры, равной 50°C. 4 мл агара смешивают с равным объемом противозмеиной сыворотки "Антигюрза", предварительно подогретой до температуры, равной 45°C. Полученный сывороточный агар разливают по 1 мл мерными пипетками с оттянутым концом, которые опускают до дна и по мере вытекания агара поднимают пипетку таким образом, чтобы сывороточный агар не попал на стенки пробирки и чтобы не образовались пузырьки воздуха. После застывания сывороточного агара поверх него наливают 0,5 мл 0,7% нейтрального агара, в котором осуществляется реакция антигена со специфическим антителом и образуются линии преципитации. После застывания нейтрального агара в него вливают 0,5 мл средства. Пробирку закрывают резиновой пробкой и выдерживают в термостате при температуре, равной 37°C. В течение не более четырех суток в слое нейтрального агара должны появиться линии преципитации (яд гюрзы). Стабильность средства в процессе длительного хранения определяется по исследуемым образцам при температурах 4 и 20°C.

Качество исследуемого препарата оценивают по физико-химическим параметрам: pH, вязкости, плотности, по реакции преципитации, а также по сохранению коагулирующей активности. Результаты исследования стабильности средства в процессе длительного хранения представлены в таблице 3.

Данные таблицы показывают, что в процессе хранения при температуре, равной 20°C изменяется только значение pH. Данный параметр изменяется заметно на 0,1 уже в течение первых трех месяцев и на 0,2 в течение четвертого месяца. На пятом месяце хранения при температуре 20°C препарат уже не соответствует требованиям фармакопейной статьи. Предварительные данные тонкослойнохроматографического анализа препарата показывают, что это связано с качественными изменениями компонентов.

В процессе хранения при температуре, равной 4°C исследуемый препарат сохраняет свои необходимые физикохимические и биологические параметры в течение 6 месяцев.

"Гюрзотоксин" применяют следующим образом:

Опыты проводились на 20 кроликах породы Шиншелла массой около 100,0 г. Животные были подразделены на 2 группы. Специфическая, гемостатическая активность средства на опытах *in Vivo* определялась по методике, предложенной Исхаки Ю.Б. в прототипе.

В первой группе животных в области передней брюшной стенки разрезом вызывалось кровотечение. Животным на кровоточащую поверхность прикладывался марлевый тампон, смоченный раствором яда гюрзы (1:5000 с разными сроками длительности хранения). На одну аппликацию уходило 1,5 - 2 мл средства.

Во второй, контрольной группе, кровотечение останавливали с помощью сухих тампонов. Результаты оценивались по времени остановки кровотечения, по общему состоянию животных. Яд гюрзы во всех случаях оказывал заметное кровоостанавливающее действие.

В прототипе время остановки кровотечения на седьмой день прикладывания тампона, смоченного раствором яда гюрзы составило 30 ± 2 с, на пятнадцатый день - 130 ± 7 .

Результаты определения времени остановки кровотечения под действием раствора яда гюрзы (1:5000) приведены в таблице 4.

Как видно из таблицы, раствор яда гюрзы (1:5000) в процессе естественного хранения в течение 6 месяцев сохраняет свою специфическую гемостатическую активность. У кроликов первой группы признаки интоксикации не наблюдались.

Вокруг разрезов не было никаких признаков воспалительной реакции.

При гистологическом исследовании в опытной группе было отмечено усиление роста капилляров грануляционной ткани, интенсивная пролиферация фибропластов, ранний фибриногенез коллагена и особенно интенсивная эпителизация раневого дефекта.

Опасность токсических веществ для человека в значительной мере предопределяется их способностью к кумуляции в организме. Знание кумулятивных свойств яда или условий, которые могут привести к кумуляции, особенно важно для патогенеза интоксикации, так как это явление лежит в основе хронических отравлений.

Для определения пороговых и подпороговых доз гюрзотоксина проведен двухнедельный эксперимент с аппликацией препарата крысам в дозах 1:2500, 1:5000 и 1:7500 мл. Показатели снимались у животных каждый день и через неделю восстановительного периода.

В течение всего времени затравки гибели животных существенного различия в прибавлении веса у опытных и контрольных животных не выявлено. Также не найдено изменений показателя "Норкового рефлекса" и двигательной активности, характеризующих функциональное состояние нервной системы животных.

Видимых изменений в массе внутренних органов, приведенных в таблице 5, также не наблюдается.

Содержание общего белка в крови, гликогена в ткани печени и билирубина крови, также находятся в пределах нормы (табл.6).

Полученные результаты показывают, что по токсикологическим критериям вредности пороговой дозой гюрзотоксина является 1:2500, не действующей - 1:5000.

Концентрация фибриногена в первой серии опытов через 5 минут после введения гюрзотоксина снижалась до 1 мг/мл, а через 10-15 минут после отравления наступала афибриногенемия.

Во второй серии опытов через 5-10 минут и через 3 часа после введения препарата уровень фибриногена постепенно снижался до 1-2 мг/мл, афибриногенемия не отмечалась.

На второй день, после введения гюрзотоксина у животных второй серии уровень фибриногена был в пределах нормы, а на 3-4 день повышался, нормализуясь к пятому дню. Эти данные говорят о том, что качественное восстановление фибриногена происходит значительно медленнее, чем количественное.

Как показали данные проведенных испытаний для заявляемого гемостатического средства "гюрзотоксин" обеспечивается достижение следующих показателей:

- средство не обладает токсическими свойствами, не оказывает побочных действий, срок годности продлен от 2 недель до 6 месяцев, ускорилось время остановки кровотечения до 1 минуты, что способствует сокращению сроков выздоровления.

Формула изобретения

Гемостатическое средство, содержащее яд гюрзы, хлорид натрия, новокаин, дистиллированную воду и стабилизатор, **отличающееся** тем, что в качестве стабилизатора оно содержит бентонит при следующем соотношении компонентов,

Яд гюрзы	0,019-0,021
Хлорид натрия	0,855 - 0,945
Новокаин	0,38 -0,42
Бентонит	2,85 -3.15
Вода дистиллированная	остальное

Таблица 1

№/№ п/п	Наименование ингредиентов	Исследуемые растворы			
		1	2	3	4
1	Вода дистиллированная, мл	500	500	500	500
2	Порошок хлорида натрия, г	4,5	4,5	4,5	4,5
3	Порошок новокаина, г	2,0	2,0	2,0	2,0
4	Бентонит, г	-	15,0	-	-
5	Каолинит, г	-	-	15,0	-
6	Яд гюрзы, г	0,02	0,02	0,02	0,02
7	10%-ный раствор хлорида кальция, мл	-	-	-	8,1

Таблица 2

№/№	Исследуемый раствор	Время свертывания крови				Время рекальцификации крови			
		Кровь крысы		Кровь кролика		Кровь крысы		Кровь кролика	
		Время, с	% к конт- ролю	Время, с	% к конт- ролю	Время, с	% к конт- ролю	Время, с	% к конт- ролю
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	75,0+-10,0	26,3+-10,0	79,0+-7,0	25,9+-10,0	44,0+-3,0	66,6	44,0+-1,0	59,45
2	2	32,5+-2,5	11,4+-2,5	37,5+-2,5	12,29+-2,5	34,0+-1,0	51,5	35,0+-1,0	47,29
3	3	72,5+-2,5	25,4+-2,5	87,5+-7,5	28,68+-7,5	47,0+-1,0	71,2	50,0+-2,0	67,56
4	4	41,5+-3,5	14,56+-3,5	49,0+-3,0	16,06+-3,0	42,0+-2,0	63,6	43,0+-2,0	58,1
5	контроль	280-290		300-210		60-72		70-78	

Таблица 3

Вре (мес)	Параметри								Коагулирующая активность	
	РН		Вязкость		Плотность		Реакция Преципи- Тации			
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
1	6,5	6,6	0,053	0,053	1,23	1,23	+	+	29,0+-3,0	29,0+-3,0
2	6,5	6,7	0,053	0,053	1,23	1,23	+	+	30,0+-2,0	35,0+-2,0
3	6,5	6,8	0,053	0,053	1,23	1,23	+	+	30,0+-3,0	42,0+-4,0
4	6,6	7,0	0,053	0,053	1,23	1,23	+	+	30,0	40,0+-3,0
5	6,6	7,2	0,053	0,053	1,23	1,23	+	+	31,0+-1,0	41,0+-1,0
	6,6	7,3	0,053	0,053	1,23	1,23	+	+	31,0+-1,0	41,0+-1,0

Таблица 4

Время остановки кровотечения (с)						
При применения раствора яда грызсы через						При сухой тампонаде (2г)
1мес,	2мес,	3мес,	4мес,	5мес,	6 мес,	
29+-4	29+-2	31+-3	30+-3	35+-1	32+-2	185+-10

Таблица 5

Группа животных	Перво- начальная масса тела, г	Масса тела через 2 мес., г	Масса органов в 1×10^{-7} кг/0,1 кг массы тела				
			Сердце	Печень	Селезенка	Почки	Мозг
Опытная	190,0+-4,0	210,0+-8,5	425,0+-12,5	2976,0+-25,0	643,0+-11,5	760,0+-22,5	592,0+-37,0
Контрольн ая	183,0+-3,0	203,0+-7,0	418,0+-14,2	2997,0+-31,9	640,0+-17,5	775,0+-22,3	609,0+-31,5

Таблица 6

Группа животных	Общий белок сыворотки крови, г	Гликоген в ткани печени, г%	Билирубин крови, МГ %
Опытная	17,3+-0,12	2,2+-0,1	0,1
Контрольная	17,1+-0,07	2,0+-0,2	0,1