

## ПОВЫШЕНИЕ ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МИДАЗОЛАМА ПРИ ЕГО МИКРОКАПСУЛИРОВАНИИ

**М.А. Юдин**

д.м.н., доцент, начальник отдела,  
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины (Санкт-Петербург)

**С.В. Чепур**

д.м.н., профессор,  
начальник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины (Санкт-Петербург)

**А.Ф. Быкова**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины (Санкт-Петербург)  
E-mail: [anna-kurpyakova@rambler.ru](mailto:anna-kurpyakova@rambler.ru)

**М.С. Вахвияйнен**

лаборант,  
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины (Санкт-Петербург)

**С.Н. Субботина**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины (Санкт-Петербург)

Проведено сравнительное исследование противосудорожной эффективности микрокапсулированных форм мидазолама на основе альгината и полилактид-ко-гликолида на модели токсического судорожного синдрома, вызванного пентилентетразолом. Показано, что включение мидазолама в полимерные частицы на основе альгината натрия с соотношением мидазолама и полимера 1:9 способствует увеличению длительности противосудорожного эффекта и защитного действия при профилактическом введении за 5–30 мин до отравления.

**Ключевые слова:** мидазолам, микрокапсулирование, пролонгированная форма, противосудорожное действие, пентилентетразол.

**Для цитирования:** Юдин М.А., Чепур С.В., Быкова А.Ф., Вахвияйнен М.С., Субботина С.Н. Повышение противосудорожной эффективности мидазолама при его микрокапсулировании. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(6):50–55. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-06-08>

На сегодняшний день для терапии токсического судорожного синдрома используют препараты из класса бензодиазепинов, многие из которых зарегистрированы в Российской Федерации (РФ) в виде инъекционных форм, что позволяет применять их для неотложной терапии. К настоящему времени синтезировано и исследовано более двух тысяч бензодиазепинов, к наиболее эффективным из которых можно отнести диазепам и мидазолам.

Мидазолам, в отличие от диазепама, обладает более выраженной фармакологической активностью. В клиническом исследовании RAMPART, посвященном оценке противосудорожных средств, мидазолам по эффективности существенно превосходил диазепам [1]. В экспериментальных исследованиях мидазолам на различных моделях кинд-лига (ингибиторы холинэстеразы, ГАМК-литики, пестициды) проявлял более выраженное защитное и нейропротекторное действие по сравнению с

другими бензодиазепинами [2]. В ряде стран препарат на его основе (дормикум) применяют интраназально для лечения эпилепсии [3].

Несмотря на высокую эффективность, мидазолам характеризуется коротким периодом полувыведения, что существенно ограничивает возможность его использования для терапии судорожного синдрома. Указанное обстоятельство актуализирует необходимость проведения исследований по разработке пролонгированных форм мидазолама и оценке их эффективности. В качестве одной из таких форм, позволяющих повысить биодоступность бензодиазепамина, можно рассматривать микрокапсулы на основе альгината и полилактид-ко-гликолида.

Цель исследования – сравнительное изучение противосудорожной активности микрокапсулированных форм мидазолама на модели пентилентетразоловых судорог.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 500 белых нелинейных мышах-самцах с массой тела 27–32 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе при свободном доступе к воде. Предварительно все они находились в карантине не менее 14 суток. Все манипуляции проводили в соответствии с правилами и принципами гуманного обращения с животными.

Изучение противосудорожной активности мидазолама и полученных на его основе микрокапсулированных образцов проводили *in vivo* на модели судорожного синдрома, вызванного внутримышечным (в/м) введением пентилентетразола (ПТЗ) в дозе 1 ЛД<sub>99</sub> из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Введение микрокапсулированных образцов и мидазолама осуществляли внутривентрикулярно (в/б) из расчета 1 мл на 100 г массы тела животных за 1–150 мин до применения ПТЗ. Контрольной группе животных вводили только токсикант (введение лекарственных препаратов и растворителя не проводили). В микрокапсулированные образцы мидазолам включали из расчета достижения дозы 0,62 мг/кг.

Применяли следующие образцы мидазолама:

мидазолам (свободная форма) – *ex tempore* готовили рабочие растворы с использованием субстанции мидазолама гидрохлорида (производства Россия);

образец № 30 – на основе полилактид-ко-гликолида (PLGA) с соотношением мидазолама и полимера 1:9 (размер частиц  $14,2 \pm 4,9$  мкм; доля высвободившегося мидазолама 96,6%; время высвобождения 5 ч);

образец № 40 – на основе PLGA с соотношением мидазолама и полимера 1:19 (размер частиц  $4,0 \pm 2,0$  мкм; доля высвободившегося мидазолама 20,2%; время высвобождения 32 ч);

образец № 43 – на основе альгината с соотношением мидазолама и полимера 1:9 (размер частиц  $10,3 \pm 4,2$  мкм; доля высвободившегося мидазолама 83,1%; время высвобождения 200 ч);

образец № 44 – на основе альгината с соотношением мидазолама и полимера 1:19 (размер частиц  $12,5 \pm 5,9$  мкм; доля высвободившегося мидазолама 91%; время высвобождения 200 ч).

Микрокапсулированные образцы мидазолама №№ 30, 40, 43 и 44 были отобраны в ходе предыдущих исследований и характеризовались высокой

абсорбцией и эффективностью включения препарата (44,8–97,4% в зависимости от образца).

Выраженность судорог оценивали согласно балльной шкале [4]. Проявления судорожной активности в 1 и 2 балла объединяли и обозначали как «судороги 1–2-й степени», в 3 и 4 балла – как «судороги 3–4-й степени». Выраженные проявления судорожного синдрома (мощные клонико-тонические судороги с утратой постурального рефлекса, судороги в боковом положении, опистотонус, судороги типа «дикий бег») выделяли в отдельную группу «судороги 5-й степени». Регистрировали время развития судорог и гибели животных.

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью пакета Statistica 10. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05. Для сравнения средних величин показателей использовали непараметрические методы. Для количественных признаков в сравниваемых группах производили оценку медиан и процентилей. Сравнение количественных показателей выполняли с помощью критерия Краскела–Уоллиса, качественных – с помощью точного критерия Фишера. Анализ выживаемости (времени до события) проводили с использованием метода Каплана–Майера, при этом сравнение выживаемости в группах осуществляли с помощью критерия Гехана–Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения продолжительности противосудорожного действия мидазолама на начальном этапе исследования препарат вводили в свободной форме мышам в дозе 0,62 мг/кг в различные сроки до отравления животных ПТЗ (табл. 1).

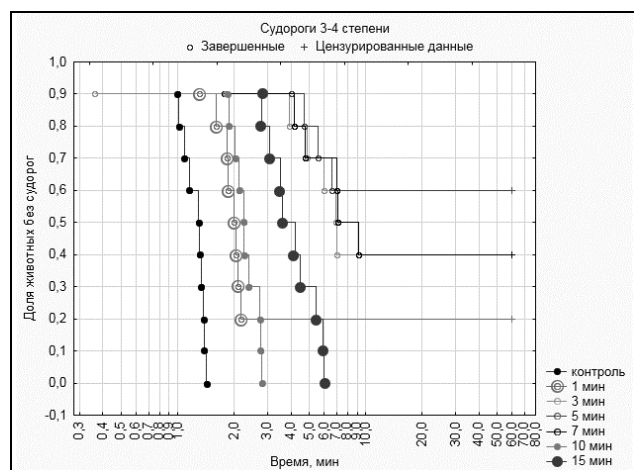
Распределение латентного периода (ЛП) судорог различной степени выраженности в виде кривых Каплана–Майера при профилактическом введении мидазолама представлено на рис. 1–2.

Профилактическое введение мидазолама за 3–7 мин до отравления мышей ПТЗ вызывало статистически значимое увеличение ЛП судорог различной степени выраженности по сравнению с показателем группы животных, не получавших препарат. Введение мидазолама за 5 мин до отравления полностью предупреждало возникновение судорог 5-й степени и значительно снижало долю животных с судорогами 3–4-й степени (со 100% в контроле до 40% при введении мидазолама).

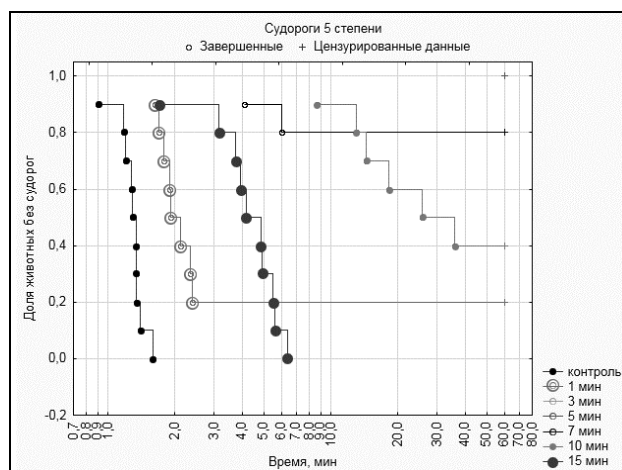
**Таблица 1. Эффективность противосудорожного действия мидазолама при его профилактическом введении мышам на модели отравления пентилентетразолом в дозе 1 ЛД<sub>99</sub>**

Группа	Срок профилактики, мин	Латентный период судорог 3–4-й степени, мин	Латентный период судорог 5-й степени, мин
Контроль	–	1,29 [1,09;1,36]	1,31 [1,20; 1,34]
Мидазолам	1	2,02 [1,82;2,17]	2,02 [1,78; 2,39]
	3	6,95 [4,85;60,00]*	60,00 [60,00; 60,00]*
	5	60,00 [5,58;60,00]*	60,00 [60,00; 60,00]*
	7	8,14 [4,79;60,00]*	60,00 [60,00; 60,00]*
	10	2,25 [2,01;2,74]	30,79 [14,43; 60,00]
	15	3,91 [3,07;5,46]	4,51 [3,73; 5,50]

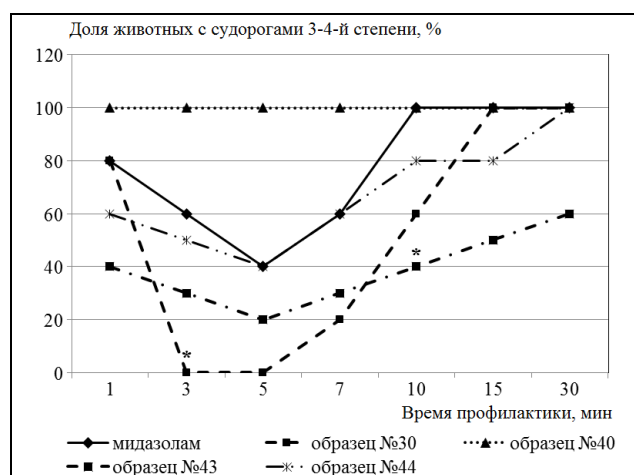
Примечание: \* – различия по сравнению с контролем статистически значимы при  $p < 0,000063$  (критерий Краскела-Уоллиса).



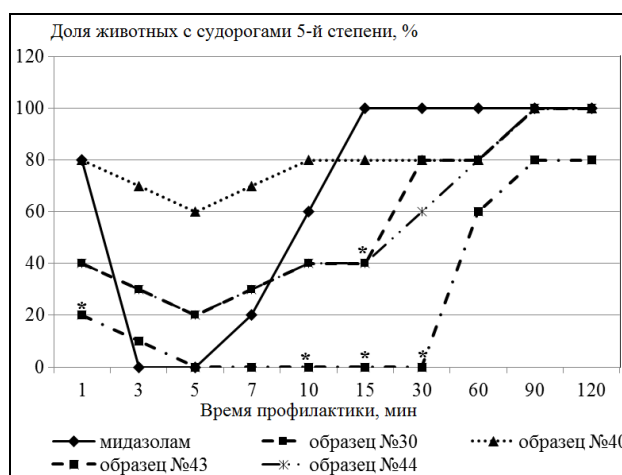
**Рис. 1.** Распределение латентного периода судорог 3-4-й степени в виде кривых Каплана-Мейера при профилактическом введении мидазолама



**Рис. 2.** Распределение латентного периода судорог 5-й степени в виде кривых Каплана-Мейера при профилактическом введении мидазолама



**Рис. 3.** Доля животных с судорогами 3-4-й степени в зависимости от времени профилактического введения мидазолама и микрокапсулированных образцов на его основе



**Рис. 4.** Доля животных с судорогами 5-й степени в зависимости от времени профилактического введения мидазолама и микрокапсулированных образцов на его основе

Увеличение срока профилактики негативно сказывалось на противосудорожной эффективности мидазолама, что подтверждает непродолжительность действия препарата.

С целью сравнительной оценки противосудорожной эффективности микрокапсулированных образцов мидазолама регистрировали долю животных с судорогами различной степени выраженности при профилактическом введении образцов за 1–120 мин до отравления мышей ПТЗ. Полученные экспериментальные данные представлены на рис. 3–4.

Введение образца № 40 не приводило к снижению доли животных с судорогами. Судороги 3–4-й степени регистрировали у 100% животных в группе, 5-й степени – у 60–80% животных при всех сроках профилактики.

При введении образцов № 30 и № 43 отмечали снижение доли животных с судорогами 3–4-й степени в сравнении с мидазоламом. Статистически значимое снижение показателя фиксировали при профилактическом введении образца № 30 за 3 мин и образца № 43 за 10 мин до отравления.

По влиянию на количество животных с судорогами 3–4-й степени образец № 44 практически не отличался от мидазолама в свободной форме.

Уменьшение доли мышей с судорогами 5-й степени в сравнении с мидазоламом наблюдали при профилактическом применении образцов №№ 30, 43 и 44 за 10–60 мин до интоксикации ПТЗ. При этом наибольшей эффективностью обладал образец № 43. Его введение экспериментальным животным в период 5–30 мин до отравления позволило полностью предотвратить развитие судорог 5-й степени.

Наряду с оценкой противосудорожной активности проводили изучение защитной эффектив-

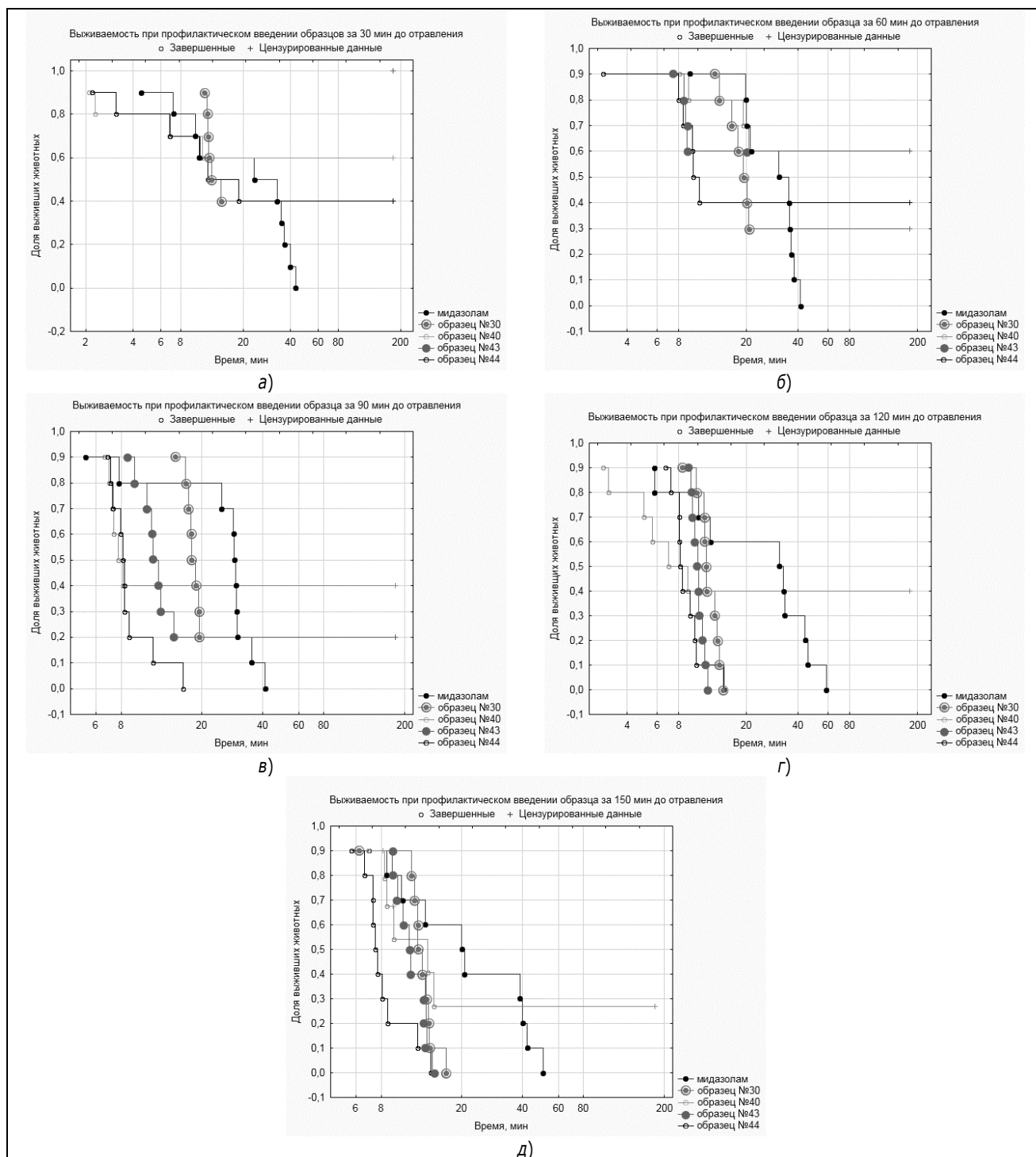
ности микрокапсулированных образцов в сравнении с мидазоламом по показателям времени жизни и доли выживших животных в период до 3 ч от момента интоксикации ПТЗ. Данное время было определено исходя из максимального значения времени жизни мышей в контрольной группе животных (введение ПТЗ без применения каких-либо препаратов), которое составило не более 60 мин, а также с учетом требуемого времени для оказания врачебной помощи с момента начала интоксикации.

Как было показано, мидазолам оказывает противосудорожное действие при профилактическом введении за 3–7 мин до отравления. При введении в более ранние сроки противосудорожная активность препарата заметно снижается. Наряду с противосудорожным действием, бензодиазепин проявляет защитную эффективность, что подтверждается уменьшением количества погибших животных при отравлении ПТЗ в сравнении с контролем. Однако при введении ранее 15 мин до отравления защитная эффективность мидазолама не проявляется. Учитывая необходимость пролонгирования длительности действия мидазолама, в частности за счет применения форм с замедленным высвобождением, целесообразно проводить сравнение защитной эффективности микрокапсулированных образцов при более ранних сроках профилактического введения. В этой связи сравнение выживаемости мышей проводили при введении образцов в сроки 30–150 мин до начала интоксикации, когда мидазолам не проявлял свою эффективность. Полученные данные по сравнительной защитной эффективности образцов, в частности распределение времен жизни мышей в виде кривых Каплана–Майера в различных экспериментальных группах, представлены в табл. 2 и на рис. 5.

**Таблица 2. Время жизни мышей при профилактическом введении мидазолама и микрокапсулированных образцов на его основе на модели отравления пентилентетразолом в дозе 1 ЛД<sub>99</sub>**

Срок профилактики, мин	Время жизни, мин				
	Мидазолам	Образец № 30	Образец № 40	Образец № 43	Образец № 44
30	28,1 [10,0; 36,3]	13,6 [11,9; 180,0]	180 [6,8; 180,0]	180* [180,0; 180,0]	15,4 [6,9; 180,0]
60	33,1 [20,0; 36,5]	19,7 [16,4; 180,0]	180 [19,2; 180,0]	180 [8,8; 180,0]	10,2 [8,5; 180,0]
90	29,1 [25,0; 29,9]	18,2 [17,2; 19,5]	8,0 [7,2; 180,0]	11,9 [10,7; 14,5]	8,2* [7,3; 8,8]
120	31,8 [10,5; 43,6]	11,6 [11,3; 13,5]	8,1 [5,0; 180,0]	10,4 [9,6; 11,1]	8,3 [8,1; 9,9]
150	20,3 [10,1; 39,8]	12,4 [11,7; 13,7]	9,2 [8,3; 14,5]	11,1 [9,6; 13,3]	7,6* [7,3; 8,6]

Примечание: см. табл. 1.



**Рис. 5.** Распределение времен жизни в виде кривых Каплана-Майера при различных сроках профилактического введения мидазолама и микрокапсулированных образцов: а - 30 мин; б - 60 мин; в - 90 мин; г - 120 мин; д - 150 мин

Показано, что введение мышам образцов №№ 40 и 43 за 30–60 мин до отравления сопровождалось снижением доли погибших животных в сравнении с показателем для мидазолама, при этом профилактическое введение образца № 43 за 30 мин до интоксикации полностью предотвращало гибель экспериментальных животных.

При введении животным образца № 43 в более ранние сроки защитная эффективность его заметно снижалась. Применение образцов № 30 и № 44 не приводило к статистически значимому улучшению значений показателей защитной эффективности.

Таким образом, наибольшую противосудорожную и защитную эффективность проявляет образец № 43, в составе которого в качестве полимера для микрокапсулирования был использован альгинат натрия с соотношением мидазолама и полимера 1:9. Профилактическое применение образца в срок от 5 до 30 мин позволяет снизить долю животных с судорогами 3-4-й степени, полностью предотвратить развитие судорог 5-й степени и гибель экспериментальных животных.

## ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных сравнительных исследований противосудорожной и защитной эффективности микрокапсулированных форм мидазолама на основе альгината и полилактид-ко-гликолида показано преимущество полимерных частиц на основе альгината натрия. Профилактическое введение мидазолама в виде полимерных частиц на основе альгината натрия с соотношением мидазолама и полимера 1:9 (образец № 43) за 530 мин 30 мин до отравления пентилентетразолом позволило полностью предотвратить у экспериментальных животных появление мощных клонико-

тонических судорог, сопровождающихся утратой постурального рефлекса и опистотонусом, а также гибель мышей.

2. Полученные результаты могут быть обусловлены более длительным высвобождением действующего вещества из состава частиц на основе альгината и позволяют рекомендовать полимер в качестве более предпочтительного для создания пролонгированной формы бензодиазепа при использовании технологии микрокапсулирования.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. McMullan J., Sasson C., Pancioli A., Silbergleit R. Midazolam Versus Diazepam for the Treatment of Status Epilepticus in Children and Young Adults: A Meta-Analysis // *Acad. Emerg. Med.* 2010; 17 (6): 575–582.
2. Niquet J., Gezalain M., Baldwin R., Wasterlain CG. Neuroprotective effects of deep hypothermia in refractory status epilepticus // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2015; 2 (12): 1105–1115.
3. Deshmukh P.V., Kulkarni S.S., Parchandekar M.K., Sikchi S.P. Comparison of preanesthetic sedation in pediatric patients with oral and intranasal midazolam // *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 2016; 325 (8): 353–358.
4. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы / М.: Медицина. 1997. 352 с. (Kryzhanovskij G.N. Obshchaya patofiziologiya nervnoj sistemy / M.: Medicina. 1997. 352 c.).

Поступила после доработки 11 марта 2019 г.

# INCREASE IN THE ANTICONVULSANT EFFICACY OF MIDAZOLAM DURING ITS MICROENCAPSULATION

© Authors, 2019

**M.A. Judin**

Dr.Sc. (Med.), Associate Professor,  
State Research Test Institute of Military Medicine of the Russian Federation Defense Ministry (St. Petersburg)

**S.V. Chepur**

Dr.Sc. (Med.), Professor,  
State Research Test Institute of Military Medicine of the Russian Federation Defense Ministry (St. Petersburg)

**A.F. Bykova**

Ph.D. ( Biol.), State Research Test Institute of Military Medicine of the Russian Federation Defense Ministry (St. Petersburg)  
E-mail: anna-kurpyakova@rambler.ru

**M.S. Vahviyanen**

Laboratorian, State Research Test Institute of Military Medicine of the Russian Federation Defense Ministry (St. Petersburg)

**S.N. Subbotina**

Ph.D. ( Biol.), State Research Test Institute of Military Medicine of the Russian Federation Defense Ministry (St. Petersburg)

**Purpose of the study.** A comparative study of the anticonvulsant activity of microencapsulated forms of midazolam on the model of pentilene tetrazol seizures.

**Materials and methods.** Anticonvulsant activity of midazolam and microencapsulated samples of midazolam based on alginate and polylactide-co-glicolide was evaluated on white outbred male mice on a model of convulsive syndrome caused by the intramuscular administration of pentilene tetrazole at a dose of 1 LD<sub>99</sub>.

**Results.** It has been established that the inclusion of midazolam in polymer particles based on sodium alginate with a ratio of midazolam and polymer 1:9 contributes to an increase in the duration of the anticonvulsant effect and the protective action of prophylactic administration 5-30 minutes before poisoning.

**Findings.** The advantage of sodium alginate-based polymer particles over polylactide-co-glicolide-based particles with respect to the anticonvulsant and protective efficacy of midazolam in experiments on mice is shown.

**Key words:** midazolam, microencapsulation, prolonged form, anticonvulsant action, pentilene tetrazole.

**For citation:** Judin M.A., Chepur S.V., Bykova A.F., Vahviyanen M.S., Subbotina S.N. Increase in the anticonvulsant efficacy of midazolam during its microencapsulation. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2019;22(6):50–55. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-06-08>