

УДК 577.3

МЕТОД МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЛУЦЕНТИС И ЭЙЛЕА, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ НОВООБРАЗОВАНИЮ СОСУДОВ

© 2022 г. Л.М. Балашова*, **, Н.А. Бакунина*, **, В.А. Намиот***, И.И. Колесниченко****, Ю.Д. Кузнецова*, **, С.В. Лесовой**, Ж.М. Салмаси*, С.Н. Удальцов*****

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
E-mail: blm1962@yandex.ru

**НП Международный научно-практический Центр пролиферации тканей, 119034, Москва, ул. Пречистенка, 29/14

***Институт ядерной физики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

****Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 31/4

*****ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2

Поступила в редакцию 15.07.2021 г.

После доработки 14.10.2021 г.

Принята к публикации 06.12.2021 г.

Электрохимическим методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии изучена возможность определения препаратов «Луцентис» и «Эйлеа», препятствующих новообразованию сосудов. Показано, что метод пригоден для определения указанных препаратов. Рассмотрена динамика изменения их концентрации. Таким образом, расширен ряд органических веществ, которые определяются данным методом.

Ключевые слова: мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, анти-VEGF препараты, эйлеа, луцентис.

DOI: 10.31857/S000630292203022X, EDN: ASMEPN

Среди электрохимических методов анализа, одним из наиболее информативных является метод инверсионной вольтамперометрии. Этот метод широко используется при анализе неорганических веществ, в частности тяжелых металлов. Однако реализация метода инверсионной вольтамперометрии требует тщательной пробоподготовки, заключающейся в удалении из анализируемой пробы органических веществ, которые существенным образом влияют на вид аналитических вольтамперограмм. С другой стороны, способность органических веществ изменять поведение электрохимической системы, содержащей катионы различных металлов, также может быть использована для анализа соответствующих объектов. В Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (Москва) с целью электрохимического анализа органических веществ был разработан метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии [1]. Этим ме-

тодом определяется изменение электрохимической активности катионов металлов в растворе в результате их взаимодействия с органическими веществами. Метод позволяет осуществлять идентификацию различных веществ на основании анализа характерных изменений вольтамперных кривых, происходящих в результате введения различных веществ в исходную тест-систему. Измерения можно проводить на одном индикаторном электроде, что является преимуществом по сравнению с мультисенсорными методами, требующими применения набора электродов.

Ранее метод экспресс-диагностики биологических объектов с использованием мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии был опробован нами для ранней диагностики глаукомы по сыворотке крови [2]. В дальнейшем работоспособность и эффективность метода была показана нами, в частности, при определении ряда

офтальмологических препаратов — визомитина [3, 4], ланостерола [5], бетоптика и его дженериков [6, 7], а также местноанальгезирующих препаратов — наропина, хирокаина и лидокаина [8].

В данной работе была оценена возможность применения метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии для экспресс-определения препаратов «Луцентис» (Новартис Фарма Штейн АГ, Швейцария) и «Эйлеа» (Ветгер Фарма-Фертигунг ГмБХ Байер, Германия).

Оба препарата используются в офтальмологии для лечения влажной формы возрастной макулярной дегенерации. Ранибизумаб (активное вещество препарата луцентиса) избирательно связывается с изоформами эндотелиального фактора роста сосудов и предотвращает их взаимодействие с их рецепторами на поверхности клеток эндотелия, что приводит к подавлению неоваскуляризации и пролиферации сосудов. Подавляя рост новообразованных сосудов хориоидеи в сетчатку, ранибизумаб останавливает прогрессирование экссудативно-геморрагической формы возрастной макулярной дегенерации и макулярного отека при сахарном диабете и окклюзии (тромбоз) вен сетчатки. Афлиберцепт (активное вещество препарата эйлеа) связывает сосудистый эндотелиальный фактор роста А с более высокой аффинностью, чем естественные рецепторы или другие препараты, в частности, ранибизумаб). Также афлиберцепт является единственным препаратом, способным связывать плацентарный фактор роста, вовлеченный в патогенез заболеваний сетчатки. Эйлеа имеет увеличенный период выведения из глаза, и это позволяет говорить о его более длительном клиническом эффекте. Согласно опубликованным данным продолжительность супрессии внутриглазного VEGF после интравитреального введения эйлеа в два раза превышает данный показатель у луцентиса. Большая продолжительность действия препарата является важным фактором, способствующим снижению общего количества требуемых инъекций для терапии хронических заболеваний сетчатки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования препаратов эйлеа и луцентис осуществляли с помощью электрохимического мультисенсорного анализатора ЭЛ-02 (Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва). Общий вид анализатора и схема планарной электродной системы были представлены в работах [2–2]. Были использованы планарные электроды (ООО «КолорЭлектроникс», Москва), представляющих собой пропиленовую пластину с нанесенными электродами (углеродный материал) и хлорсеребряным электродом сравнения. Схема планарного электрода была представлена в работе [2]. Так как пла-

нарные электроды являются одноразовыми, производить подготовку поверхности индикаторного электрода не требовалось. Сформированная на индикаторном электроде матрица сенсоров в нашем случае обеспечивала работу прибора в формате «Электронный язык» [9].

Вольтамперограммы, получаемые методом инверсионной вольтамперометрии, имеют характерный вид и хорошо воспроизводимы. Они представляют собой зависимости тока от потенциала рабочего электрода, меняющегося по линейному закону во времени. Известно, что состав фоновых электролитов заметно влияет как на величину токов растворения металлов, так и на потенциалы пиков. В данной работе в качестве электрохимической тест-системы использовали раствор электролита, содержащий катионы ряда металлов, обладающих способностью образовывать комплексные соединения с органическими веществами: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Hg^{2+} [1]. Введение в тест-систему анализируемых органических веществ приводит к изменению спектра вольтамперограмм. Эти изменения характерны для каждого из органических веществ (или смеси веществ), что позволяет проводить их идентификацию. При электрорастворении металлов с поверхности электрода потенциалы пиков токов растворения являются определяющей характеристикой растворяющегося металла, а их амплитуда зависит от количества электрорастворенного металла. Возрастание прочности образовавшихся комплексов приводит к увеличению высоты пика тока растворения металла и соответственно к уменьшению его ширины [10].

При проведении испытаний на планарные электроды наносили 50 мкл тест-системы, содержащей ионы металлов в одинаковых концентрациях ($5 \cdot 10^{-5}$ М), и регистрировали фоновую инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов -1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой потенциала до 0.3 В. Затем на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-системы и 5 мкл исследуемых препаратов в различной концентрации и снова регистрировали инверсионные вольтамперограммы.

Всего было взято 15 проб. Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны фоновая вольтамперограмма и вольтамперограммы, полученные для препарата луцентиса в различных концентрациях *in vitro*. Можно видеть, что в присутствии луцентиса токи ионов металлов, входящих в тест-систему, изменяются в разной степени в зависимости от

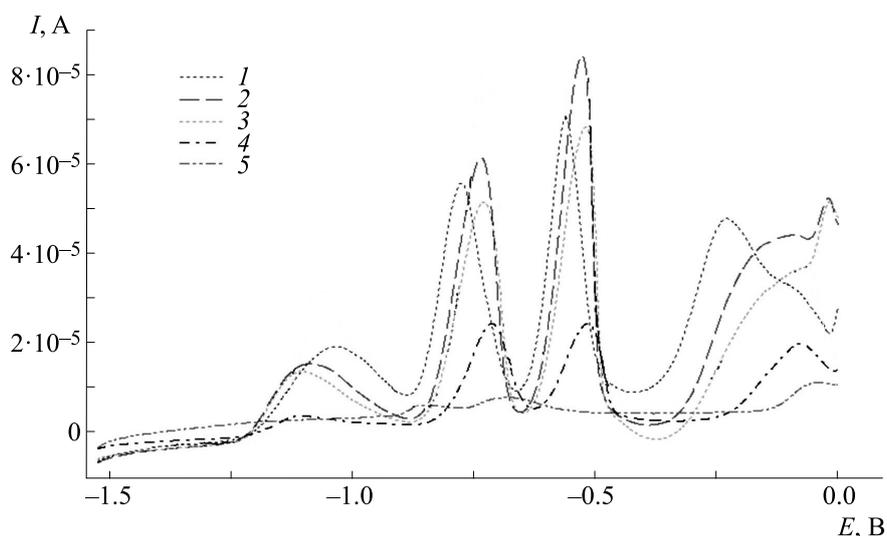


Рис. 1. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с луцентисом в различных концентрациях: 1 – тест-система, 2 – 10%, 3 – 20%, 4 – 40%, 5 – 60%.

концентрации препарата. Данные по воздействию луцентиса на тест-систему приведены в табл. 1.

Аналогичным образом было изучено влияние на тест-систему препарата эйлеа в различных концентрациях. Соответствующие вольтамперо-

граммы представлены на рис. 2, данные приведены в табл. 2.

Оказалось, что влияние обоих препаратов наблюдается в основном на токи таких металлов как медь и свинец; токи этих металлов уменьшаются от 32 до 6 мкА для меди и от 58 до 20 мкА – для свинца в случае луцентиса и немного менее – в

Таблица 1. Влияние луцентиса на тест-систему

	Концентрация луцентиса	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	–	16	45	58	32	40	80
Луцентис	10%	21	42	55	10	30	50
	20%	15	30	45	11	25	40
	40%	10	25	30	9	20	25
	60%	10	15	20	6	7	10

Таблица 2. Влияние эйлеа на тест-систему

	Концентрация эйлеа	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	–	16	45	58	32	40	80
Эйлеа	10%	10	40	54	25	21	70
	20%	10	30	45	15	15	60
	30%	9	25	35	10	10	45
	40%	9	20	30	10	13	30

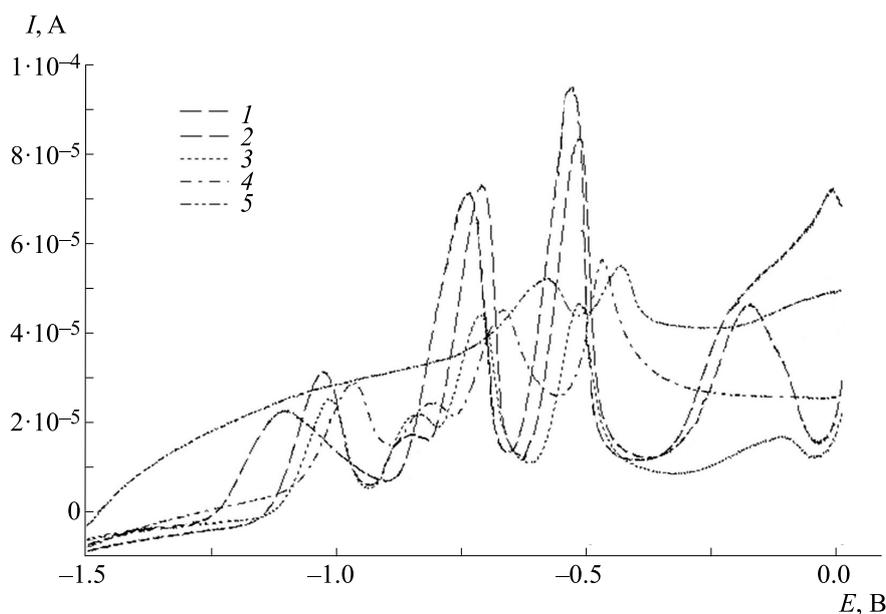


Рис. 2. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с эйлеа в различных концентрациях: 1 – тест-система, 2 – 10%, 3 – 20%, 4 – 30%, 5 – 40%.

случае эйлеа (рис. 1, кривые 2–5; рис. 2, кривые 2–5). Заметный эффект исследуемые препараты оказывают также и на токи кадмия, кобальта и ртути. Несущественным и в случае эйлеа, и в случае луцентиса оказалось только действие на ток растворения цинка.

Нужно отметить, что препарат эйлеа по сравнению с луцентисом очень быстро (в течение полутора часов) разлагается при взаимодействии с тест-системой используемого состава. Влияние луцентиса на тест-систему регистрируется значительно дольше – более шести часов. Следовательно, по отношению к использованной тест-системе эйлеа – это менее стойкий препарат во внешней среде по сравнению с луцентисом.

Таким образом, можно сделать вывод, что метод инверсионной вольтамперометрии может быть использован и для оценки содержания данных препаратов в слезной жидкости при осуществлении офтальмологических воздействий, что требует дальнейших исследований. Однако с учетом того факта, что из фармакопических описаний препаратов луцентиса и эйлеа следует, что эйлеа имеет увеличенный период выведения из глаза, эти исследования потребуют кроме тщательной подготовки (в плане стерильности) к отбору проб слезной жидкости после инъекций препаратов также отработки оптимального времени отбора проб и, возможно, изменения ионного состава используемой тест-системы.

ВЫВОДЫ

Показано, что при взаимодействии используемой тест-системой препаратов луцентис и эйлеа, тормозящих рост эндотелия сосудов и используемых как антиVEGF-препараты, влияние наблюдается наиболее значительно на токи таких металлов как медь и свинец; токи этих металлов уменьшаются от 32 до 6 мкА для меди и от 58 до 20 мкА для свинца.

Влияние препарата эйлеа на тест-систему уменьшается через полтора часа, тогда как влияние луцентиса регистрируется значительно дольше – более шести часов. Следовательно, по отношению к тест-системе эйлеа – менее стойкий препарат по сравнению с луцентисом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Н. Андреев, В. М. Ганшин, А. Н. Доронин и др., Патент на изобретение № 2375705 от 22.08.2008.
2. И. И. Колесниченко, А. Л. Клюев, В. М. Ганшин и др., Физикохимия поверхности и защита материалов **50** (4), 440 (2014).

3. И. И. Колесниченко, Е. П. Кантаржи и А. Н. Доронин, в сб. *Труды 6-й Всероссийской науч.-практич. конф. «Измерения в современном мире – 2017»* (СПбПУ, СПб., 2017), сс. 33–37.
4. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология* **23** (9–10), 6 (2017).
5. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика* **63** (4), 825 (2018).
6. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика* **64** (6), 1088 (2019).
7. I. I. Kolesnichenko, L. M. Balachova, and E. P. Kantarzhii, *Am. J. Anal. Chem.* **7** (7), 588 (2016).
8. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика* **65** (6), 1211 (2020).
9. Г. К. Будников, В. Н. Майстренко и М. Р. Вяслев, *Основы современного электрохимического анализа* («Мир», М., 2003).
10. Г. Л. Шлефер, *Комплексообразование в растворах* («Химия», М., 1964).

Multisensor Stripping Voltammetry in Analysis of Ophthalmic Drugs Lucentis and Eylea Used to Stop Neovascularization

L.M. Balashova^{*, **}, N.A. Bakunina^{*, **}, V.A. Namiot^{***}, V.I. Kolesnichenko^{****},
Yu.D. Kuznetsova^{*, **}, S.V. Lesovoy^{**}, G.M. Salmasi^{*}, and S.N. Udaltsov^{*****}

^{*}*Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

^{**}*International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, ul. Prechistenka 29/14, Moscow, 119034 Russia*

^{***}*Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

^{****}*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii prosp. 31/4, Moscow, 119071 Russia*

^{*****}*Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

This paper is devoted to multisensor stripping voltammetry as electrochemical technique applied for determination of antiVEGF drugs Lucentis and Eylea that suppress the growth of abnormal new blood vessels. It is shown that this method can be used for this purpose. The dynamics of changes in their concentration over time is considered. As a result, more organic substances have been added into the list of organic substances that are determined by this method.

Keywords: multisensor stripping voltammetry, planar electrodes, antiVEGF drugs, Eylea, Lucentis