

МЕТОД МУЛЬТИСЕНСОРНОЙ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В АНАЛИЗЕ ПРОТИВОГЛАУКОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ

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

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

#E-mail: blm1962@yandex.ru

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

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

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

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

Поступила в редакцию 23.05.2021 г.

После доработки 06.02.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Электрохимическим методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии изучена возможность определения в слезной жидкости ряда противоглаукомных препаратов (арутимола, пилокарпина, тусупта и др.). Показано, что метод эффективен для определения указанных препаратов. Рассмотрена динамика изменения их концентрации во времени. Таким образом, расширен список органических веществ, которые могут определяться методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии.

Ключевые слова: мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия, планарные электроды, противоглаукомные препараты, арутимол, тимолол, тусупт, азопт, дорзопт, пилокарпин, фотил.

DOI: 10.31857/S0006302922040214, EDN: IVVGIO

Глаукома — одна из наиболее тяжелых форм офтальмопатологии, занимающая лидирующее место после катаракты среди причин слепоты и слабовидения населения Земли. До сих пор не существует эффективных методов лечения глаукомы, можно говорить только о более или менее удовлетворяющих методиках, как минимум приостанавливающих дальнейшее развитие заболевания.

В Российской Федерации в нозологической структуре слепоты и слабовидения доля глаукомы составляет 29%. Распространенность глаукомы среди населения России за последние годы выросла в 2,8 раза [1]. Глаукома занимает первое место в структуре первичной инвалидности по зрению в большинстве регионов Российской Федерации.

На практике используется большое число противоглаукомных препаратов местного применения, различающихся по механизму действия. При

этом большинство из них ориентированы на снижение уровня внутриглазного давления, как за счет подавления продукции водянистой влаги, так и за счет активизации оттока внутриглазной жидкости из глаза. Для определения фармакокинетики и эффективного использования используемых противоглаукомных препаратов существенна оценка динамики изменения их концентрации во времени после применения. С этой целью вполне успешно может быть задействован разработанный в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (Москва) метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии [2, 3]. Этим методом 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, происходя-

щих в результате введения различных веществ в исходную тест-систему. На получаемых вольтамперограммах при этом фиксируются изменения пиков токов растворения металлов, которые можно определить для каждого металла тест-системы по отдельности или оценить изменение всей вольтамперограммы интегрально. Измерения проводят на одном индикаторном электроде, что имеет большое преимущество по сравнению с мультисенсорными методами, использующими набор измерительных электродов.

Работоспособность и эффективность метода экспресс-диагностики биологических объектов с использованием мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии ранее была продемонстрирована нами при определении некоторых применяемых в офтальмологии анестетиков — наропина, хирокаина и лидокаина [4], ропивакаина [5], а также ряда других офтальмологических препаратов — визомитина [9], ланостерола и фентанила [10], в том числе противоглаукомного препарата бетоптика и некоторых его дженериков [11, 12].

В данной работе оценены возможности метода мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии при анализе ряда широко применяемых противоглаукомных препаратов (арутимола, азопта, тусопта и др., см. табл. 1) по оценке их содержания в слезной жидкости после инстилляций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение фоновой вольтамперограммы. На планарные электроды производства ООО НПП «Автоком» (Москва) наносили 50 мкл тест-системы, состоящей из 0.05 М KCl и катионов металлов (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} и Hg^{2+} , каждый в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М), затем снимали инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов — 1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой в анодную сторону до потенциала до 0.3 В. Полученная вольтамперограмма являлась фоновой (рис. 1, кривая 1).

Влияние слезной жидкости здоровых людей на тест-систему. Для изучения влияния на тест-систему слезной жидкости в конъюнктивальный мешок глаза помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальной бумаги, которую предварительно тщательно промывали в спирте и дистиллированной воде и сушили при температуре 80°C в течение трех часов). Через определенное время (1 мин) этот бумажный диск извлекали из конъюнктивального мешка, помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой и снимали вольтамперограмму при тех же условиях, в которых получали фоновую вольтамперограмму.

На рис. 1 (кривая 2) показано влияние слезной жидкости на усредненную вольтамперограмму, полученную у десяти здоровых людей. Разброс (ошибка) результатов для слезной жидкости составляет 12%.

Влияние исследуемых препаратов на тест-систему. На планарные электроды фирмы «Автоком» наносили 50 мкл тест-системы, снимали инверсионную вольтамперограмму при потенциале катодного осаждения металлов минус 1.55 В относительно хлорсеребряного электрода с последующей разверткой в анодную сторону потенциала до 0.3 В. Полученная вольтамперограмма являлась фоновой. Затем на электрод помещали 50 мкл свежего раствора тест-системы и исследуемые препараты в различной концентрации, после чего снова регистрировали вольтамперограммы.

Влияние исследуемых препаратов на слезную жидкость. Исследуемые препараты по одной капле вносили в конъюнктивальный мешок глаза и туда же помещали диск диаметром 8 мм из предварительно обработанного пористого материала (фильтровальная бумага). Через определенное время бумажный диск извлекали из конъюнктивального мешка и помещали на электрод с нанесенной на него тест-системой (50 мкл). Измерения проводили через 3 мин, 1 ч, далее через каждый час в течение шести часов после инстилляций препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие исследуемых препаратов с тест-системой. На рис. 1 (кривые 3–6) показаны вольтамперограммы, полученные для тусопта в различных концентрациях *in vitro*. Можно видеть, что в присутствии тусопта токи ионов металлов, входящих в тест-систему, изменяются в разной степени в зависимости от концентрации тусопта: с ростом концентрации ток иона ртути возрастает, а у остальных металлов — уменьшается.

На рис. 2 и 3 приведены аналогичные данные соответственно для арутимолы и пилокарпина.

Так как в препарате дорзопт основное действующее вещество является тем же, что и в тусопте, влияние дорзопта на тест-систему аналогично влиянию тусопта и на отдельном рисунке не приводится. Также не приводится соответствующий рисунок для азопта, поскольку его действующее вещество — бринзоламид — влияет на тест-систему аналогично дорзоламиду.

Результаты по влиянию всех исследованных противоглаукомных препаратов на тест-систему приведены в табл. 1.

Видно, что с увеличением концентрации препаратов заметно уменьшаются токи свинца, кадмия и кобальта. Токи цинка, меди и ртути изменяются менее существенно.

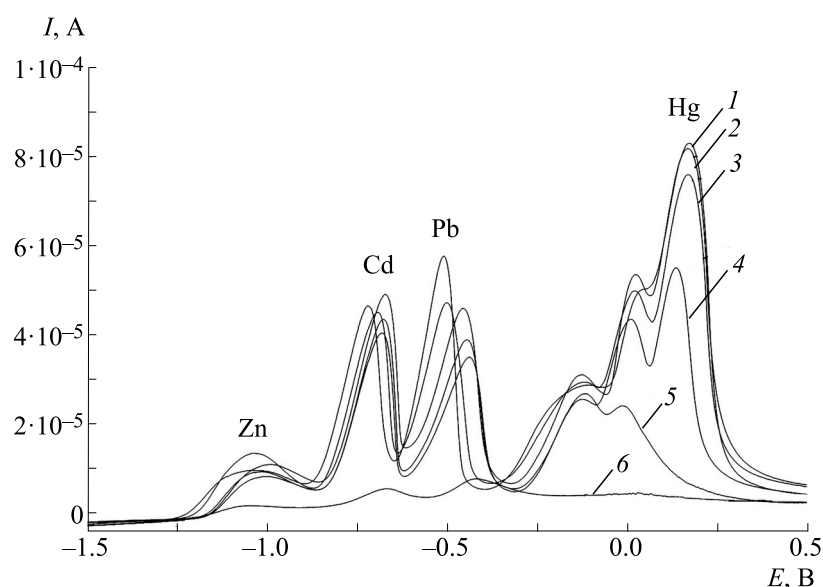


Рис. 1. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с тросоптом в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость здоровых людей, 3 – 10%, 4 – 12%, 5 – 25%, 6 – 30%.

Таким образом, метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии может быть эффективным при определении в тест-системе исследованных противоглаукомных препаратов.

Поведение исследуемых препаратов в слезной жидкости в зависимости от времени после их инстилляций. Влияние слезной жидкости на тест-систему через 6 ч после инстилляций исследованных противоглаукомных препаратов показано в табл. 3. Так, при воздействии как арутимол, так и тросопта токи растворения металлов изменяются несущественно, откуда следует, что концентрации арутимол и тросопта в слезной жидкости в течение 6 ч также не меняются. Следовательно,

все перечисленные препараты через 6 ч после инстилляций продолжают оказывать действие на слезную жидкость. Что касается пилокарпина, то из рис. 4а (кривая 2) следует, что через 6 ч после инстилляций его действие на тест-систему ослабевает, в отличие от арутимол и тросопта (рис. 4б,в).

Данные о влиянии слезной жидкости на тест-систему через 12 ч после инстилляций препаратов приведены в табл. 4. Видно, что влияние препаратов тросопта, дорзопта, азопта, арутимол и фотила на тест-систему даже через 12 ч после инстилляций все еще достаточно велико. Следовательно, препараты достаточно устойчивы во

Таблица 1. Исследованные противоглаукомные препараты

№	Препарат	Активное вещество
1	Арутимол (Франция)	Тимолола гидромалеат
2	Тимолол (Московский эндокринный завод)	Тимолола малеат
3	Тросопт (Франция)	Дорзоламида гидрохлорид
4	Азопт (Бельгия)	Бринзоламид
5	Дорзопт (Румыния)	Дорзоламида гидрохлорид
6	Пилокарпин (Россия)	Пилокарпина гидрохлорид
7	Фотил (Россия)	Пилокарпина гидрохлорид, тимолола малеат, бензалкония хлорид

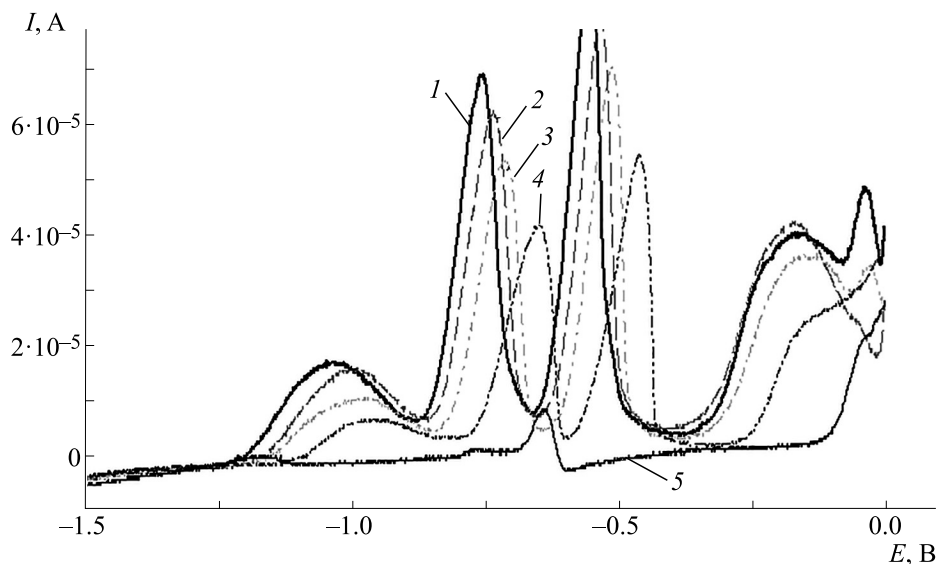


Рис. 2. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с арутимолом в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость здоровых людей, 3 – 10%, 4 – 12%, 5 – 25%.

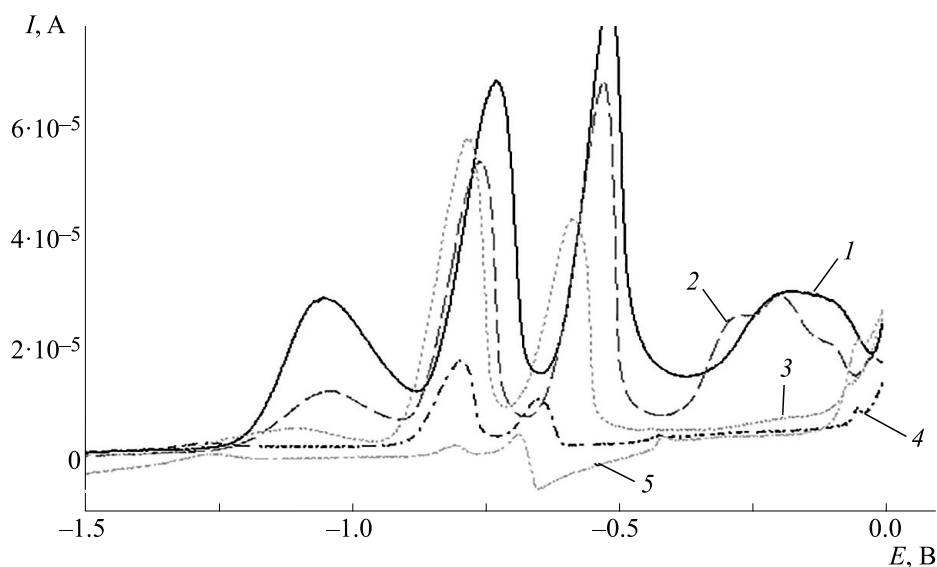


Рис. 3. Инверсионные вольтамперограммы тест-системы с пилокарпином в различной концентрации: 1 – тест-система, 2 – слезная жидкость здоровых людей, 3 – 10%, 4 – 12%, 5 – 25%.

времени и через 12 ч после инстилляции продолжают оказывать действие на слезную жидкость и глазную поверхность.

Как видно из табл. 3 и 4, разные группы препаратов оказывают неодинаковое влияние на разные металлы, входящие в состав тест-системы. Например, препараты арутимол и тимолол оказывают достаточно сильное влияние на такие металлы как кобальт, медь и кадмий. Препараты трусопт, дорзопт и азопт увеличивают пик тока ртути, но уменьшают пики токов цинка. Поэтому говорить о более сильном влиянии одной из

групп препаратов на тест-систему по сравнению с другой группой препаратов нельзя, так как это требует дополнительных исследований. Действие препарата фотил обусловлено, вероятно, наличием двух активных компонентов – пилокарпина гидрохлорида и тимолола малеата.

ВЫВОДЫ

1. Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии позволяет анализировать в формате «Электронный язык» влияние

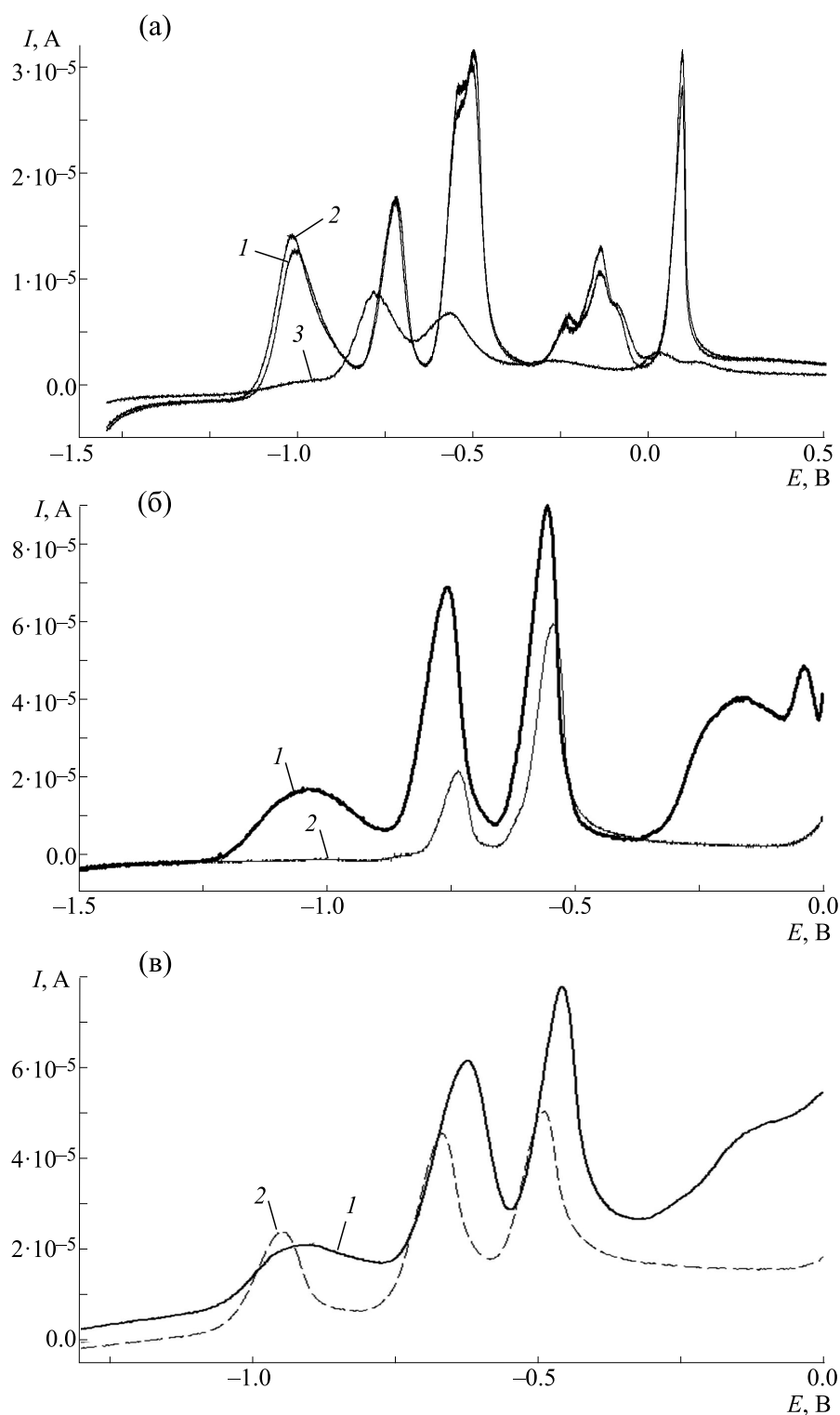


Рис. 4. (а) — Влияние слезной жидкости на тест-систему после инстилляций пилокарпина: 1 — тест-система, 2 — через 3 мин после инстилляций, 3 — через 6 ч после инстилляций. (б) — Влияние слезной жидкости на тест-систему после инстилляций арутимолола: 1 — тест-система, 2 — через 6 ч после инстилляций. (в) — Влияние слезной жидкости на тест-систему после инстилляций трузопта: 1 — тест-система, 2 — через 6 ч после инстилляций.

Таблица 2. Влияние исследованных противоглаукомных препаратов на тест-систему

Препарат	Концентрация, %	Пики токов растворения металлов, мкА					
		Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Фон	—	16	45	58	32	40	80
Арутимол	10	20	48	60	20	30	80
	12	15	40	45	15	25	75
	25	15	25	30	10	15	85
	30	15	15	20	5	7	85
Тимолол	10	19	49	60	20	30	77
	12	16	42	44	15	23	78
	25	15	26	30	10	15	84
	30	15	15	22	5	7	85
Трусопт	10	20	40	50	15	20	75
	12	20	43	55	12	15	80
	25	21	50	60	10	15	85
	30	22	50	63	10	13	90
Азопт	10	15	35	40	15	20	65
	12	10	33	35	10	15	60
	25	9	25	30	10	12	55
	30	6	20	23	10	10	60
Дорзопт	10	20	40	50	15	20	75
	12	20	43	55	12	15	80
	25	21	50	60	10	15	85
	30	22	50	63	10	13	90
Пилокарпин	10	3	34	48	20	28	56
	12	15	60	62	36	38	85
	25	20	65	70	30	35	90
	30	25	65	72	25	30	95

Таблица 3. Влияние слезной жидкости на тест-систему через 6 ч после инстилляций исследованных противоглаукомных препаратов

Слезная жидкость	Пики токов растворения металлов, мкА					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Тест-система	16	45	58.0	32	40.0	80.8
Здоровые люди	12	34.6	50.4	23.2	36	74.6
Больные глаукомой после инстилляций пилокарпина	22	40	50	20.3	30.1	75.5
Больные глаукомой после инстилляций трусопта	13	35.5	40.5	20.4	18.0	68.2
Больные глаукомой после инстилляций азопта	12	34	30	15	16	60
Больные глаукомой после инстилляций дорзопта	13	35	39	20	19	70
Больные глаукомой после инстилляций арутимолла	12	31	42	19.5	20.0	65

Таблица 4. Влияние слезной жидкости на тест-систему через 12 ч после инстилляций исследованных противоглаукомных препаратов

Слезная жидкость	Пики токов растворения металлов, мкА					
	Zn	Cd	Pb	Cu	Co	Hg
Тест-система	16	45	58.0	32	40.0	80.8
Здоровые люди	12	34.6	50.4	23.2	36	74.6
Больные глаукомой после инстилляций пилокарпина	22	40	50	20.3	30.1	75.5
Больные глаукомой после инстилляций турсопта	13	36	41	21	19	68
Больные глаукомой после инстилляций фотила	14	40	39	22	20	70
Больные глаукомой после инстилляций азокта	12	37	34	18	19	60
Больные глаукомой после инстилляций дорзопта	13	36	39	20	19	70
Больные глаукомой после инстилляций арутимолла	12	36	42	19.5	20.0	67

исследованных противоглаукомных препаратов на слезную жидкость во времени.

2. Показано, что влияние препаратов турсопта, дорзопта, азокта, арутимолла и фотила на тест-систему даже через 12 ч после инстилляций все еще достаточно велико. Следовательно, препараты достаточно устойчивы во времени и через 12 ч после инстилляций продолжают оказывать действие на слезную жидкость и глазную поверхность.

3. Показано, что пилокарпин менее устойчив во времени и через 6 часов после инстилляций его влияние на слезную жидкость уменьшается.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с участием пациентов соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников экспериментов получено письменное информированное согласие на проведение исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.П. Нестеров, *Глаукома* (Медицинское информационное агентство, М., 2014).
2. В. Н. Андреев, В. М. Ганшин, А. Н. Доронин и В. П. Луковцев, Патент РФ № 2375705, опубл. 10.12.2009.
3. В. П. Луковцев, А. Н. Доронин, В. А. Семенова и В. М. Ганшин, *Электрохимия*, **45** (7), 869 (2009).
4. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика*, **65** (6), 1211 (2020).
5. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика*, **67** (1), 134 (2022).
6. 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.
7. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология*, **23** (9–10), 6 (2017).
8. Л. М. Балашова, В. А. Намиот, И. И. Колесниченко и др., *Биофизика*, **63** (4), 825 (2018).
9. И. И. Колесниченко, Л. М. Балашова и Е. П. Кантаржи, *Клин. геронтология*, **23** (9–10), 36 (2017).
10. И. И. Колесниченко, Л. М. Балашова и Л. С. Коробова, *Биофизика*, **66** (3), 577 (2021).
11. I. I. Kolesnichenko, L. M. Balachova, and E. P. Kantarzh, *Am. J. Anal. Chem.*, **7** (7), 588 (2016).
12. Л. М. Балашова, И. И. Колесниченко, В. А. Намиот и др., *Биофизика*, **64** (6), 1088 (2019).

A Multisensory Stripping Voltammetry Method for Analysis of Anti-Glaucoma Drugs

L.M. Balashova*, **, N.A. Bakunina*, **, V.A. Namiot***, I.I. Kolesnichenko****, Yu.D. Kuznetsova*, **, A.A. Balashov**, 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

An electrochemical method for multisensory stripping voltammetry was used to explore whether it is appropriate for determination of anti-glaucoma drugs (arutimol, pilocarpine, trusopt, etc.) in tear fluid. It is shown that this method is effective for determination of above drugs. The dynamics of changes in drug concentrations over time was studied. As a result, the list of organic substances, that can be determined by the method of multisensory stripping voltammetry, is expanded.

Keywords: multisensory stripping voltammetry, planar electrodes, antiglaucoma drugs, arutimol, timolol, trusopt, azopt, dorzopt, pilocarpine, fotil