

# ЗАЩИТА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

## ПОИСК НОВЫХ ПУТЕЙ УТИЛИЗАЦИИ НЕПРИГОДНЫХ К МЕДИЦИНСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ\*

Е.А. Тюмина<sup>1</sup>, К.А. Мигачева<sup>1</sup>, А.Н. Мухутдинова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет

Пермский государственный национальный исследовательский университет  
ул. Букирева, 15, Пермь, Россия, 614990

<sup>2</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН  
ул. Голева, 13, Пермь, Россия, 614081

Дротаверина гидрохлорид и кодеина фосфат, обладающие спазмолитическим и анальгетическим действием, оценивали на способность к биологическому разложению с использованием актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов. Эксперименты проводили в аэробных условиях с бактериальными культурами. Скрининг актинобактерий в отношении фармацевтических соединений показал, что наиболее устойчивым к дротаверину и кодеину был штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647, который использовался далее в экспериментах по биотрансформации. Продолжительность процесса биотрансформации дротаверина и кодеина составляла более 90 сут. Использование свободных клеток *Rhodococcus*, предварительно выращенных при низких концентрациях исследуемых соединений, позволило уменьшить продолжительность процесса биодеградации до 60 и 90 сут. для дротаверина и кодеина соответственно. Внесение глюкозы в качестве ко-субстрата и использование иммобилизованных родококков значительно (с 60 до 7 сут.) ускорило процесс биодеградации дротаверина. ГХ-МС анализ продуктов биотрансформации показал, что конечными метаболитами дротаверина являлись 3,4-диетоксибензойная кислота, 3,4-диетоксибензальдегид и эфир 3,4-диетоксибензойной кислоты. Биотрансформация кодеина фосфата происходила с образованием гидрокодона, дигидрокодеина и 14-гидроксикодеина. Получены данные свидетельствуют о возможном участии родококков в деконтаминации природных экосистем от фармполлютантов.

**Ключевые слова:** лекарственные средства, биотрансформация, дротаверина гидрохлорид, кодеина фосфат, *Rhodococcus*

В настоящее время остро стоит проблема утилизации непригодных к медицинскому использованию лекарственных средств: фальсифицированных, бракованных, с истекшим сроком годности. Данные некачественные лекарственные

---

\* Работа выполнена при частичной поддержке гранта Программы Президиума РАН «Живая природа».

средства признаются фармацевтическими отходами и подлежат обязательному уничтожению в связи с потенциальной угрозой здоровью людей и состоянию окружающей среды [2]. Используемые способы их обезвреживания — сжигание, слив в канализацию, захоронение на специальных полигонах — не являются экологически безопасными (образование вредных побочных продуктов, неполнота очистки и пр.) и имеют ряд ограничений в своем применении. В связи с этим актуальным является поиск альтернативных технологий утилизации фармацевтических отходов.

Экологически безопасными признаются биологические технологии утилизации вредных отходов с использованием микроорганизмов. В процессах естественного самоочищения открытых экосистем доминирующую роль играют актинобактерии рода *Rhodococcus*. Выраженная экологическая пластичность, лабильность метаболической системы, полифункциональность, склонность к клеточной агрегации, способность к усвоению различных ксенобиотиков, не мицелиальный характер роста указывают на явные технологические преимущества использования родококков в качестве потенциальных биокатализаторов процессов биодеструкции многих органических соединений, в том числе и лекарственных средств [1; 7; 8].

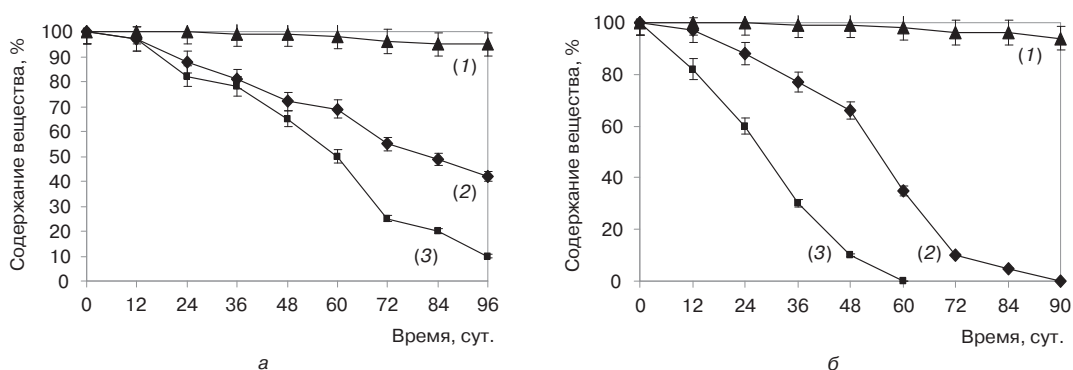
Фармакологически активным веществом многих лекарственных средств являются гетероциклические азотсодержащие соединения [5]. Широко используемыми в медицинской практике являются дротаверина гидрохлорид (ДГ,  $C_{24}H_{31}NO_4$ , CAS: 98512-6, син. Но-шпа), обладающий спазмолитическим, миотропным и сосудорасширяющим действием, а также кодеина фосфат (КФ,  $C_{18}H_{21}NO_3$ , CAS: 76-57-3), обладающий анальгезирующим, противокашлевым действием. Повсеместное применение, стабильная химическая структура данных соединений обуславливают неизбежное попадание их в окружающую среду [4; 9].

Цель настоящей работы — поиск эффективных экологически безопасных способов нейтрализации фармполлютантов на примере дротаверина и кодеина.

В работе использовали 92 штамма актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекции культур, [www.iegmr.ru/iegmcollection/strains](http://www.iegmr.ru/iegmcollection/strains)), принадлежащих к *Dietzia maris* (5 штаммов), *Gordonia rubripertincta* (5 штаммов), *G. terrae* (5 штаммов), *R. erythropolis* (14 штаммов), *R. fascians* (11 штаммов), ‘*R. longus*’ (14 штаммов), *R. opacus* (12 штаммов), *R. rhodochrous* (12 штаммов), *R. ruber* (14 штаммов). Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) исследуемых соединений в отношении родококков проводили микропланшетным методом [6]. В экспериментах по биодegradации применяли минеральную среду RS (г/л):  $K_2HPO_4$  — 2,0;  $KH_2PO_4$  — 2,0;  $KNO_3$  — 1,0;  $(NH_4)_2SO_4$  — 2,0; NaCl — 1,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,2;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  — 0,02;  $FeCl_3 \cdot 7H_2O$  — 0,001; а также фосфатный буфер (г/л):  $Na_2HPO_4$  — 8,9;  $KH_2PO_4$  — 3,39 (pH 6,9). В качестве источника углерода и энергии использовали ДГ и КФ в концентрации 20 и 40 мг/л соответственно, в виде фармацевтической субстанции, а инокулята — клетки родококков, предварительно выращенные в течение 3 сут. на мясопептонном агаре, отмытые дважды фосфатным буфером, которые вносили в среду культивирования до конечной концентрации  $2,7 \times 10^7$  кл/мл. В отдельных экс-

периментах родококки предварительно выращивали в присутствии исследуемых соединений в концентрациях, на порядок ниже исходных. Для ускорения процесса биодеструкции в среду культивирования добавляли глюкозу (0,5%) в качестве дополнительного энергетического субстрата. Культивирование родококков проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с объемом среды 100 мл на орбитальном шейкере Certomat IS (“Sartorius”, Германия) (160 об/мин, 28°C). Имобилизацию бактериальных клеток осуществляли по разработанному способу [2]. В качестве сорбента использовали опилки древесных пород, гидрофобизованные олифой. Количество иммобилизованных клеток на носителе составляло  $22,5 \pm 1,8$  мг сухих клеток/г. Процесс адсорбции родококков контролировали с использованием спектрофотометра Lambda EZ201 (“Perkin-Elmer”, США). Изменение количественного содержания лекарственных веществ в процессе биодеструкции регистрировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа LC Prominence, оборудованного колонкой с сорбентом Discovery C18® и ультрафиолетовым детектором, Shimadzu (Япония). Состав продуктов разложения лекарственных средств исследовали методом газовой хроматографии с использованием хроматографа Agilent 6890N (Agilent Technology, США) с квадрупольным масс-спектрометром Agilent MSD 5973N в качестве детектора и кварцевой колонки HP-5MS SN US 15189741-1. В качестве абиотического контроля использовали среду RS и буферный раствор, содержащие ДГ и КФ соответственно, не инфицированные бактериальной культурой. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Скрининг актинобактерий разных видов в отношении исследуемых экотоксикантов показал, что максимально толерантным штаммом к ДГ и КФ является *R. rhodochrous* ИЭГМ 647 (МПК  $\geq 200$  мг/л и  $\geq 100$  мг/л соответственно), который использовался в дальнейшем в экспериментах по биотрансформации. По нашим данным, продолжительность процесса биотрансформации ДГ и КФ свободными (нативными) клетками родококков составляла более 96 сут. (рис. 1, а).

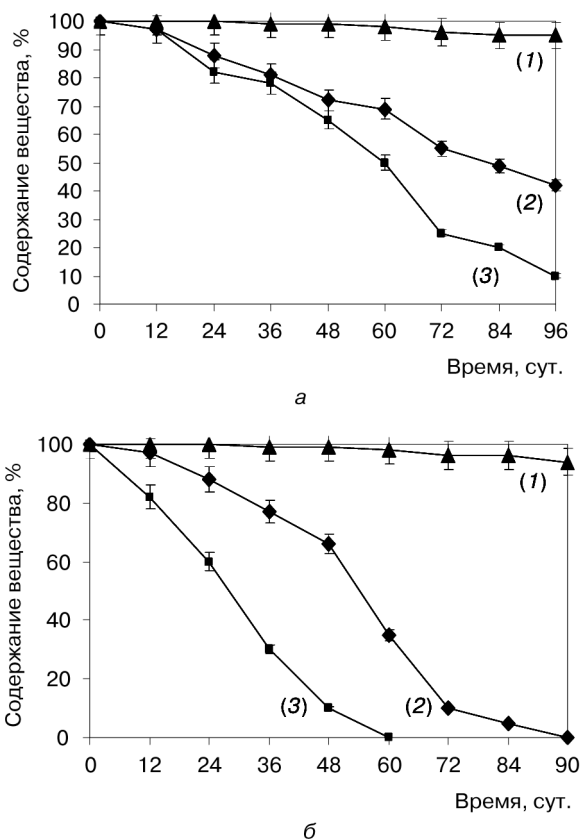


**Рис. 1.** Биодеструкция КФ (2) и ДГ (3) нативными (а) и прединкубированными (б) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647. 1 — абиотический контроль

С целью ускорения процесса биологического окисления исследуемых соединений использовали различные подходы: 1) прием прединкубации бактериальных клеток в присутствии низких концентраций ДГ и КФ, 2) введение глюкозы в

качестве энергетического косубстрата, 3) иммобилизация бактериальных клеток на твердом носителе. Как видно из рис. 1, б, использование приема предынкубации родококков в присутствии низких концентраций фармсоединений позволило сократить продолжительность процесса биотрансформации ДГ до 60 сут., а КФ — до 90 сут.

Внесение глюкозы позволило снизить продолжительность процесса биодеструкции ДГ с 60 до 42 сут. (рис. 2, а), а использование иммобилизованных на древесном носителе родококков — до 7 сут. (рис. 2, б). Однако применение данных подходов не повлияло на ускорение процесса биодеструкции КФ. Это свидетельствует об исключительной химической стабильности молекулы кодеина и требует дальнейших лабораторных исследований по оптимизации процесса его биологического окисления.



**Рис. 2.** Биодеструкция ДГ (1) и КФ (2) свободными в присутствии глюкозы (а) и иммобилизованными на древесном носителе (б) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 647

Методами ГХ-МС установлено, что конечными продуктами метаболизма ДГ являлись экологически безопасные простые ароматические соединения производные протокатеховой кислоты (в частности, 3,4-диэтоксibenзойная кислота, 3,4-диэтоксibenзальдегид, этиловый эфир 3,4-диэтоксibenзойной кислоты). Биотрансформация кодеина происходила с образованием гидрокодона, дигидро-

кодеина, и 14-гидрокодеина — продуктов с более выраженной токсичностью, что подтверждает химическую устойчивость молекулы кодеина и потенциальную опасность данного экофармполлютанта для открытых экосистем.

Полученные данные расширяют представление о каталитической активности родококков и их возможном вкладе в деконтаминацию природных экосистем от фармполлютантов.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Ившина И.Б., Рычкова М.И., Вихарева Е.В., Чекрышкина Л.А., Мишенина И.И.* Алканотрофные родококки как катализаторы процесса биодеструкции не пригодных к использованию лекарственных средств // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. № 4. С. 443–447.
- [2] *Подорожко Е.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б., Филл Д.К., Лодзинский В.И.* Композиция для получения носителя иммобилизованных микроорганизмов, расщепляющих углеводороды, и способ получения носителя // Патент на изобретение РФ № 2298033. Зарег. в Госреестре изобр. 27.04.2007.
- [3] Федеральный закон от 12.04.2010 № 63 «Об обращении лекарственных средств».
- [4] *Bennet G., Fram M., Belitz K.* Status and understanding of groundwater Quality in the Klamath Mountains study Unit, 2010: California GAMA Priority Basin Project // Water Boards. 2014. 70 pp.
- [5] *Duca G., Boldescu V.* Pharmaceuticals and personal care products in the environment // The Role of Ecological Chemistry in Pollution Research and Sustainable Development NATO. Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. 2009. P. 27–35.
- [6] *Cuenca-Estrella M., Lee-Yang W., Ciblak M.A., Arthington-Skaggs B.A.* Comparative evaluation of NCCLS M27-A and eucast broth micro dilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* specie // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002. V. 46. № 11. P. 3644–3647.
- [7] *Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.Cr.* Biodegradation and *Rhodococcus* — masters of catabolic versatility // Current opinion in Biotechnology. 2005. V. 16. P. 282–290.
- [8] *Martinkova L., Uhnakova B., Patek M.* Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // Environment International. 2009. V. 35. P. 162–177.
- [9] *Tiwari A.K., Shah H., Rajpoot A., Singhal M.* Formulation and in-vitro evaluation of immediate release tablets of drotaverine HCL // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2011. V. 3. № 4. P. 333–341.

## THE SEARCH FOR NEW WAYS DISPOSAL OF DRUGS, THAT ARE UNSUITABLE FOR MEDICAL USE

E.A. Tyumina<sup>1</sup>, K.A. Migacheva<sup>1</sup>, A.N. Mukhutdinova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biology  
Perm State National Research University  
15 Bukirev str., Perm, Russia, 614900

<sup>2</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Sciences  
13 Golev str., Perm, Russia, 614081

Drotaverine hydrochloride and codeine phosphate, antispasmodic and analgesic drugs, respectively, derived from isoquinoline, were evaluated for its biodegradability using actinobacteria from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. The experiments were performed under aerobic conditions with bacterial cultures. Screening of actinobacteria toward drugs showed that the

most drotaverine and codeine resistant strain was *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 647, which was used further in experiments biotransformation. The duration of the biotransformation process drotaverine and codeine was more than 90 days. Using free *Rhodococcus* cells pre-grown with investigated substrates reduced the duration of biodegradation to 60 days and to 90 days for drotaverine and codeine, respectively. Adding glucose as co-substrate, and the use of immobilized cells of *Rhodococcus* (from 60 to 7 days) accelerated significantly the process of drotaverine biodegradation. GC-MS analysis of transformation products resulting from drotaverine biodegradation revealed 3,4-diethoxybenzoic acid, 3,4-diethoxybenzaldehyde and 3,4-diethoxybenzoic acid ethyl ester which were detected in the culture medium until drotaverine completely disappeared. Transformation products from codeine phosphate included hydrocodone, dihydrocodeine and 14-hydroxycodone. The obtained data broadened the spectrum of organic xenobiotics oxidized by *Rhodococcus* bacteria and proved there potential in decontamination of natural ecosystems from pharma pollutants.

**Key words:** drugs, biotransformation, drotaverine hydrochloride, codeine phosphate, *Rhodococcus*

## REFERENCES

- [1] Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vihareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I. Alkanotrofnye rodokokki kak katalizatory processa biodestrukcii ne prigodnyh k ispol'zovaniju lekarstvennyh sredstv [Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci]. Prikladnaja biohimija i mikrobiologija [Applied Biochemistry & Microbiology]. 2006. № 4. S. 443–447.
- [2] Podorozhko E.A., Kujukina M.S., Ivshina I.B., Filp D.K., Lodzinskij V.I. Kompozicija dlja poluchenija nositelja immobilizovannyh mikroorganizmov, rasshhepljajushhih uglevodorody, i sposob poluchenija nositelja [Formulation of a carrier for immobilized hydrocarbon-degrading microorganisms, and a method for carrier production]. Patent na izobretenie RF № 2298033. Zareg. v Gosreestre izobr. 27.04.2007 [Priority. 19.04.2005. Registered with the Public Register for Inventions 27.04.2007].
- [3] Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 № 63 "Ob obrashhenii lekarstvennyh sredstv" [Russian Federal Law from 12.04.2010 № 61-FZ "On Circulation of Medicines"].
- [4] Bennet G., Fram M., Belitz K. Status and understanding of groundwater Quality in the Klamath Mountains study Unit, 2010: California GAMA Priority Basin Project. Water Boards, 2014, 70 pp.
- [5] Duca G., Boldescu V. Pharmaceuticals and personal care products in the environment // The Role of Ecological Chemistry in Pollution Research and Sustainable Development NATO. Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. 2009. P. 27–35.
- [6] Cuenca-Estrella M., Lee-Yang W., Ciblak M.A., Arthington-Skaggs B.A. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and eucast broth micro dilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* specie. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002. V. 46. № 11. P. 3644–3647.
- [7] Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.Cr. Biodegradation and *Rhodococcus* — masters of catabolic versatility. Current opinion in Biotechnology. 2005. V. 16. P. 282–290.
- [8] Martinkova L., Uhnakova B., Patek M. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environment International. 2009. V. 35. P. 162–177.
- [9] Tiwari A.K., Shah H., Rajpoot A., Singhal M. Formulation and in-vitro evaluation of immediate release tablets of drotaverine HCL. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2011. V. 3. № 4. P. 333–341.