**ГЕНОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ НОВОКАИНА НА *Allium fistulosum***

Работа выполнена ученицей 10 В класса: Багриновцевой Татьяной Максимовной

Учитель: Герасимова Татьяна Анатольевна

Руководитель: Склюев Валерий Витальевич

Оглавление

[ВВЕДЕНИЕ 3](#_Toc67857356)

[1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 4](#_Toc67857357)

[1.1. Структура и химические свойства новокаина 4](#_Toc67857358)

[1.2. Использование новокаина в фармакологии 5](#_Toc67857359)

[1.3. Механизмы генотоксичности 6](#_Toc67857360)

[2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 9](#_Toc67857361)

[2.1. Характеристика объекта исследования 9](#_Toc67857362)

[2.2. Методика проведения генотоксикологического мониторинга новокаина на семена Allium fistulosum 10](#_Toc67857363)

[2.3. Методика приготовления препаратов для цитогенетического исследования 10](#_Toc67857364)

[2.4.Методика цитогенетического анализа 11](#_Toc67857365)

[3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 11](#_Toc67857366)

[ВЫВОД 12](#_Toc67857367)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 13](#_Toc67857368)

[ПРИЛОЖЕНИЯ 15](#_Toc67857369)

# ВВЕДЕНИЕ

# 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Структура и химические свойства новокаина

Новокаин – белый кристаллический порошок горького вяжущего вкуса, вы­зывающий чувство онемения языка, хорошо растворимый в воде (1: 1), в спирте (1: 18), не растворимый в эфире; растворы — нейт­ральной реакции. Температура плавления 154—156°. Основание но­вокаина — бесцветные кристаллы, плохо растворимые в воде, легко в спирте, в эфире и бензоле, с температурой плавления 58—60° (безводного) или 51° (с двумя молекулами кристаллизационной воды). Существует несколько методов производства новокаина. Ос­новным исходным продуктом для этого служат n-нитротолуол или n-толуидин, из которых получают n-нитробензойную или п-аминобензойную кислоту. В процессе дальнейшего синтеза из них получают новокаин[1].

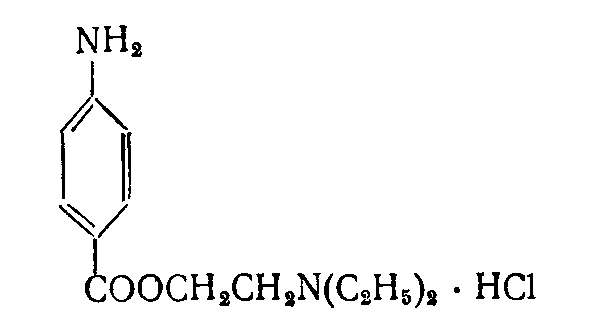


Рис. 1 Структурная ф-ла новокаина

Наиболее простым и удобным методом синтеза новокаина является переэтерификация этилового эфира л-аминобензойной кислоты (анестезина) с -диэтиламиноэтанолом в присутствии алкоголята натрия (реакция алкоголиза)[2].

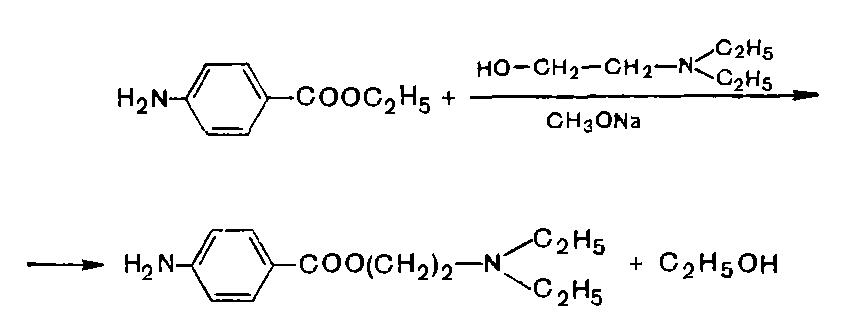


Рис. 2 Получение новокаина

### 1.2. Использование новокаина в фармакологии

В медицинской практике используют в виде гидрохлорида для инфильтрационной и проводниковой анестезии. Обладает достаточно выраженной анестезирующей активностью, но уступает в этом отношении другим препаратам. Продолжительность инфильтрационной анестезии составляет 30 мин-1 ч. Большим преимуществом новокаина является низкая токсичность. Это относится и к его метаболитам. Через слизистые оболочки новокаин проходит плохо, поэтому для поверхностной анестезии он применяется редко (иногда для этих целей его используют в оториноларингологии в высоких концентрациях - 10% растворы)[3].

По данным М. Д. Машковского (1984), продукты гидролиза новокаина являются фармакологически активными веществам. Пара-аминобензойная кислота (витамин В7(Н ) ) является частью молекулы фолиевой кислоты. По химическому строению она сходна с частью молекулы сульфаниламидов; вступая с последними в конкурентные отношения, пара-аминобензойная кислота ослабляет их антибактериальное действие. Это обстоятельство дало основание А. Ю. Пащук (1987) считать ее ингибитором сульфаниламидов. Новокаин, как производное пара-аминобензойной кислоты, также оказывает антисульфаниламидное действие. Кроме того, новокаин обладает умеренными сосудорасширяющими свойствами.

При передозировке новокаина отмечается головокружение, слабость, чувство страха, падение АД, холодный пот, тошнота, рвота, учащение и ослабление пульса, учащение дыхания, развитие коллапса. Реакция центральной нервной системы проявляется конвульсиями, судорогами, двигательным возбуждением, галлюцинациями. Нередко встречаются идиосинкразия к новокаину, которая обусловливает дерматит, шелушение кожи. Иногда новокаин дает аллергические реакции, отек слизистой оболочки, крапивницу, анафилактический шок. Новокаин кроме применения для инфильтрационной и проводниковой анестезии используется для лечебных блокад при невралгии тройничного нерва, для электрофореза при парестезиях, заболеваниях пародонта и височнонижнечелюстного сустава[4].

### 1.3. Механизмы генотоксичности

Генотоксичность\* — это…(Реймерс)[5]. Токсичные вещества потенциально мутагенны или канцерогенны, в частности, способны привести к генетической мутации или к развитию опухоли.

………………………………………………………………………….

Чаще в основе токсического действия лежат химические реакции токсиканта с определенным структурным элементом живой системы. Структурный компонент биологической системы, с которым вступает в химическое взаимодействие токсикант, называется его "рецептором" или "мишенью". Структурными элементами клеток, с которыми взаимодействуют токсиканты, как правило, являются белки, нуклеиновые кислоты, липидные элементы биомембран и селективные рецепторы эндогенных биорегуляторов (гормонов, нейромедиаторов и т.д.).

Нарушение свойств белков химическим веществом возможно различными способами, зависящими как от структуры токсиканта, так и от строения и функций белка. Возможны: денатурация белка, блокада его активных центров, связывание активаторов и молекул, стабилизирующих протеин, и т.д. В основе денатурации лежит повреждение внутрибелковых связей, поддерживающих вторичную, третичную структуру протеина. При этом наиболее часто токсиканты взаимодействуют с СООН-, NH-, OH-, SH-группами аминокислот, образующих белки. Многочисленные токсиканты, связывающиеся с SH-группами, называются тиоловыми ядами. К числу тиоловых ядов прежде всего следует отнести тяжелые металлы, такие как ртуть, мышьяк, сурьма, таллий, органические соединения этих металлов (метилртуть, люизит и т.д.). Другие металлы более активно взаимодействуют с карбоксильными группами (свинец, кадмий, никель, медь, марганец, кобальт).

Дезоксирибонуклеиновые кислоты - основной компонент хромосомного аппарата клеток. Рибонуклеиновые кислоты представлены информационной, транспортной, рибосомальной РНК. Их функция - участие в синтезе белка. Многие ксенобиотики\* (Реймерс)[5] вступают во взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, изменяя их свойства. К числу веществ, вступающих в химическое взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, относятся нитриты, сернистый, азотистый, кислородный иприты, этиленоксид, этиленимин, гидразин и его производные, гидроксиламин, нитрозамины, аренокисды, полициклические углеводороды, метаболиты афлатоксинов, соединения мышьяка и многие другие вещества. Эти токсиканты, образуют ковалентные связи с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в структуру нуклеиновых кислот. Измененные таким образом молекулы ДНК могут подвергаться дальнейшей ферментативной и неферментативной трансформации вплоть до разрушения под воздействием эндонуклеаз. Вещества с бифункциональными активными группами (иприты) могут образовывать с двунитевой молекулой ДНК перекрестные связи, при этом становиться невозможным расхождение нитей "двойной спирали", необходимое для обеспечения синтеза белков, клеточного деления. Токсиканты способны вступать во взаимодействие не только с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, но и с углеводно-фосфатной основой молекулы нуклеиновой кислоты. При этом происходит её денатурация. Полагают, что таким образом может взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами в частности формальдегид. Многие ксенобиотики образуют нековалентные связи с ДНК. При этом меняется конформация макромолекул. Так, известно высокое сродство к нуклеиновым кислотам производных акридина, которые, встраиваясь в молекулу ДНК между соседними парами оснований (интеркалация), изменяют её структуру. Таков же, вероятно, механизм действия этидиумбромида, профлавина и др. Антрациклин, хлорахин, актиномицин и некоторые другие антибиотики также изменяют конформацию нуклеиновых кислот, не образуя с ними ковалентных связей[6].

Важнейшая функция липидов - формирование биологических мембран. Вещества, разрушающие, изменяющие структуру липидов, нарушающие взаимодействие между молекулами липидов (гидрофобные связи) повреждают биологические мембраны и поэтому называются мембранотоксикантами. К числу таких относятся многие спирты, предельные и галогенированные углеводороды ("неэлектролиты"), детергенты (поверхностно-активные вещества), а также яды, обладающие фосфолипазной активностью (яды змей и т.д). Ряд токсикантов оказывает опосредованное мембранотоксическое действие, повышая уровень внутриклеточного Са2+, активируя эндогенные фосфолипазы, свободнорадикальные процессы в клетках и т.д.

Деление, рост, дифференциация клеток, их мутация и малигнизация - процессы, неразрывно связанные с обменом нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и синтезом белка. Эти процессы чрезвычайно сложны и включают множество этапов. Действие веществ, нарушающих нуклеиновый обмен и белковый синтез, в этой связи, весьма разнообразно. Подавляющее большинство механизмов токсического повреждения изучено в опытах *in vitro* на изолированных быстро размножающихся клетках, а порой даже на прокариотах. Вот почему среди приводимых в качестве примеров веществ, преобладают цитостатики, антибиотики и красители.

Повреждающее действие химических веществ на ДНК называется генотоксическим. Наиболее чувствительны к генотоксическому действию клетки, способные к делению (эмбриональные, герменативные, костного мозга, эпителия почек, кожи, слизистой желудочно-кишечного тракта и т.д.). Последствия повреждения ДНК зависят от дозы токсиканта. Высокие дозы вызывают цитостатический эффект (гибель пула делящихся клеток), более низкие - канцерогенное, тератогенное, мутагенное действие. В основе канцерогенного, тератогенного, мутагенного действия лежат по сути общие механизмы, однако превращение конкретного вещества в канцероген, тератоген, мутаген зависит от целого ряда условий (таблица 1).

Существует представление, согласно которому проникновение в организм даже единственной молекулы генотоксиканта (в отличие от токсикантов с иным механизмом токсического действия) может привести к пагубным последствиям. Дело в том, что химическое повреждение единичной молекулы ДНК в 65 единичной клетке макроорганизма, при стечении обстоятельств, может стать причиной мутогенеза, тератогенеза, канцерогенеза. Вероятность такого события бесконечно мала, но теоретически возможна. Такой характер действия веществ на биосистемы называется беспороговым[7].

Способность токсикантов индуцировать сестринские хроматидные обмены в клетках млекопитающих подробно обсуждается многими авторами. Генотоксичное действие химических факторов при остром отравлении наблюдается в виде нарушений ДНК-синтезирующей активности в семенниках, нарушений хромосом и патологических митозов в клетках костного мозга мышей[8].

Обследование лиц сельскохозяйственных районов, специализирующихся на садоводстве и имеющих постоянный контакт с фосфорорганическими пестицидами (одними из самых популярных ксенобиотиков), показало, что количество клеток с хромосомными нарушениями колеблется от 4 до 11%, в то время как в контрольной группе показатель не превышает 2%[9].

В ряде публикаций отмечено, что генотоксиканты вызывают кластогенный\* эффект в лимфоцитах крови рабочих, занятых его производством, повышение частоты спонтанных абортов у женщин, имеющих контакт с ним, и врождённых пороков развития детей, чьи родители имели профессиональный контакт с пестицидами данной группы[10].

## 

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика объекта исследования

Тест-объектами служили семена *Allium fistulosum*.

*Allium fistulosum* (лук-батун сорт «апрельский»). 2n = 16. В кариотипе достоверно идентифицируются пять пар гомологов. Остальные три пары рассматриваются как группа гомеоморфных хромосом.

Это многолетнее травянистое растение. Луковиц не образует, но формирует большую листовую массу. Плод – трехсемянная коробочка. Семена собраны в соцветие – зонтик. Корни тонкие, нитевидные[11].

#### 2.2. Методика проведения генотоксикологического мониторинга новокаина на семена Allium fistulosum

Для получения корешков в девяти чашках Петри проращивали семена данного вида лука в течение 5 дней в термостате при +20ºС. Для этого семена по 50 штук проращивали в 3-х чашках Петри для анализа генотоксичности определённых концентраций раствора новокаина: 0.001 мг и 0.025 мг. Кроме того, в трёх чашках Петри в воде были пророщены семена, используемые как контрольные.

----------------------------------------------------------------------------------------------------

Растворы новокаина приливали к семенам в чашки Петри в объеме 5 мл на чашку. На седьмые сутки проращенные корни обрезали и помещали в фиксатор (3 части этилового спирта +1 часть уксусной кислоты) на 4-8 часов. Затем корни переносили в 75% этиловый спирт. Фиксированный материал хранился в холодильнике при температуре +4ºС в течение 2-х – 3-х недель.

Цитогенетический анализ проводили стандартным способом на давленых препаратах, окрашенных ацетокармином [12].

#### 2.3. Методика приготовления препаратов для цитогенетического исследования

Зафиксированные корни помещали в ацетокармин, приготовленный по стандартной методике. Пропись приготовления ацетокармина: (уксусная кислота ледяная – 45 мл, нагретая; кармин – 2-3 г.; дистиллированная вода – 55 мл). Смесь кипятили с обратным холодильником 30-40 минут и фильтровали на второй день [12].

Окраску производили следующим образом: корни*Allium fistulosum* помещали в пузырьки с ацетокармином, которые помещали в водяную баню. Затем в течение 4 минут проводили кипячение. Далее остуженные до комнатной температуры корни переносили на предметное стекло, обрезали кончик корня лука и в 45% уксусной кислоте готовили давленный под покровным стеклом препарат для получения монослоя клеток. Края давленого препарата замазывали бесцветным лаком, чтобы предотвратить испарение уксусной кислоты.

#### 2.4. Методика цитогенетического анализа

# 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

# ВЫВОД

# СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сайт: Удобная усадьба. Синтез новокаина. Ссылка: http://cozyhomestead.ru/Kulinariya\_12406.html.

2. Преображенский Н.А., Генкин Э.И. Химия органических лекарственных веществ 1953. – 200 с.

3. Харкевич Д. А. Фармакология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 908 с.

4. Яценко И. В., Рыбалов О. В., Андриянова О. Ю., Дубровина Е. В. Современные местноанестезирующие лекарственные средства в стоматологии. Учебное пособие. Рецензенты: Рузин Г. П., Николишин А. К. Полтава – 1998

5. Реймерс Н.Ф. Популярный биологический словарь //Москва Наука 1991. - 195с.

6. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. М.: Медицина, 1998. – 328 с.

7. Куценко С. А. Основы токсикологии. Санкт-Петербург, 2002. Издательство: Военно-Мед. Академия. – 395 с.

8. Недопитанская Н. Н., Присяжнюк Т. Н., Петровская О. Г. Отдаленные токсические эффекты действия хлорофоса. // Гигиена и санитария – 1991.

9. Каган Ю. С. Токсикология фосфорорганических пестицидов. М.: Медицина, 1987. – 164 с.

10. Савченко Я. А., Минина В. И., Баканова М. Л. Хромосомные аберрации и полиморфизм генов ферментов детоксикации ксенобиотиков и репарации ДНК у работников теплоэнергетики. // Гигиена и санитария. – 2012.

11. Жизнь растений: В 6-ти т. / Гл. ред. Тахтаджян А. Л. Цветковые растения / Под редакцией академика АН СССР Тахтаджяна А.Л., М.: Просвещение. Т. 6. 1982.

12. Гастимский С.А., Дьякова М.И, Ивановская Е.В. Жизнь растений. – М.:МГУ, 1974. – 275 с.

Склюева О.А., Селезнева Е.С. Цитогенетический мониторинг почв вдоль автотранспортных магистралей с использованием растительных тест-объектов: квалификационная работа. – Самара, - 2008.

# 

# ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1. Условия воздействия генотоксиканта, определяющие форму развития токсического процесса

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Токсический процесс** | **Чувствительная ткань** | **Оптимальное время воздействия** | **Продолжительность действия и доза** |
| Канцерогенез | Любая пролиферирующая ткань | Неопределеное; любая стадия митоза | Обычно хроническое, беспороговое |
| Мутагенез | Герменативные клетки | Все стадии гаметогенеза | Острое и хроническое, беспороговое |
| Тератогенез | Все зародышевые ткани | Наивысшая - на ранних стадиях дифференциации тканей | Только острое, в дозах выше пороговых |

Таблица 2. Пророст семян за 19.10.2020

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Название образца: | Размер  (мм) | Размер  (мм) |
| Контроль 1  Всхожесть: 16/50 | 5 | 6 |
| 5 | 6 |
| 5 | 5 |
| 6 | 5 |
| 6 | 5 |
| 4 | 5 |
| 4 | 2 |
| 3 | 2 |
| Контроль 2  Всхожесть: 15/50 | 8 | 5 |
| 8 | 5 |
| 5 | 2 |
| 5 | 2 |
| 5 | 1 |
| 5 | 3 |
| 5 | 2 |
| 5 | 1 |
| Контроль 3  Всхожесть: 19/50 | 7 | 2 |
| 7 | 3 |
| 8 | 1 |
| 10 | 1 |
| 5 | 2 |
| 5 | 2 |
| 5 | 2 |
| 5 | 3 |
| 5 | 1 |
| 2 | 2 |
| 0.001 мг Новокаина 1  Всхожесть: 12/50 | 5 | 3 |
| 5 | 3 |
| 5 | 1 |
| 5 | 2 |
| 2 | 3 |
| 2 | 2 |
| 0.001 мг Новокаина 2  Всхожесть: 12/50 | 10 | 2 |
| 5 | 3 |
| 5 | 2 |
| 5 | 2 |
| 5 | 2 |
| 4 | 3 |
| 0.001 мг Новокаина 3  Всхожесть: 10/50 | 7 | 5 |
| 8 | 2 |
| 4 | 3 |
| 5 | 2 |
| 5 | 1 |
| 0.025 мг Новокаина 1  Всхожесть: 6/50 | 5 | 2 |
| 2 | 2 |
| 3 | 1 |
| 0.025 мг Новокаина 2  Всхожесть: 3/50 | 4 | 2 |
| 5 |  |
| 0.025 мг Новокаина 3  Всхожесть: 7/50 | 7 | 5 |
| 7 | 2 |
| 4 | 1 |
| 5 |  |

Таблица 3. Пророст семян за 21.10.2020

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название образца: | Размер  (мм) | Размер  (мм) | Размер  (мм) | Размер  (мм) |
| Контроль 1  Всхожесть: 18/50 | 18 | 15 | 19 | 17 |
| 20 | 20 | 7 | 8 |
| 30 | 18 | 16 | 13 |
| 11 | 17 | 23 |  |
| 90 | 12 | 4 |  |
| Контроль 2  Всхожесть: 18/50 | 17 | 22 | 9 | 15 |
| 16 | 9 | 13 | 16 |
| 13 | 16 | 8 | 9 |
| 3 | 13 | 11 |  |
| 9 | 18 | 4 |  |
| Контроль 3  Всхожесть: 22/50 | 12 | 22 | 31 | 20 |
| 10 | 45 | 12 | 25 |
| 3 | 25 | 30 | 6 |
| 8 | 27 | 16 | 10 |
| 5 | 25 | 20 |  |
| 15 | 28 | 17 |  |
| 0.001 мг Новокаина 1  Всхожесть: 16/50 | 9 | 12 | 3 | 5 |
| 16 | 8 | 10 | 3 |
| 4 | 7 | 9 | 1 |
| 12 | 12 | 4 | 12 |
| 0.001 мг Новокаина 2  Всхожесть: 19/50 | 5 | 13 | 15 | 24 |
| 9 | 12 | 20 | 15 |
| 10 | 10 | 4 | 4 |
| 1 | 16 | 5 | 5 |
| 7 | 6 | 1 |  |
| 0.001 мг Новокаина 3  Всхожесть: 17/50 | 20 | 9 | 1 | 9 |
| 2 | 2 | 12 | 12 |
| 7 | 5 | 1 |  |
| 15 | 1 | 1 |  |
| 3 | 2 | 29 |  |
| 0.025 мг Новокаина 1  Всхожесть: 6/50 | 7 | 7 | 5 |  |
| 8 | 8 | 2 |
| 0.025 мг Новокаина 2  Всхожесть: 6/50 | 3 | 3 | 4 |  |
| 3 | 4 | 2 |
| 0.025 мг Новокаина 3  Всхожесть: 10/50 | 9 | 7 | 4 | 6 |
| 11 | 5 | 4 |  |
| 12 | 5 | 6 |  |

Таблица 4. Пророст семян за 23.10.2020

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название образца: | Размер  (мм) | Размер  (мм) | Размер  (мм) | Размер  (мм) |
| Контроль 1  Всхожесть: 19/50 | 1 | 11 | 60 | 40 |
| 8 | 10 | 50 | 10 |
| 13 | 13 | 15 | 15 |
| 70 | 90 | 16 | 15 |
| 90 | 90 | 90 |  |
| Контроль 2  Всхожесть: 18/50 | 80 | 50 | 16 | 11 |
| 60 | 2 | 80 | 40 |
| 30 | 10 | 10 | 50 |
| 90 | 80 | 40 |  |
| 12 | 70 | 60 |  |
| Контроль 3  Всхожесть: 22/50 | 1 | 18 | 15 | 70 |
| 2 | 90 | 15 | 13 |
| 7 | 10 | 13 | 80 |
| 15 | 90 | 14 | 90 |
| 60 | 11 | 60 |  |
| 11 | 10 | 50 |  |
| 0.001 мг Новокаина 1  Всхожесть: 16/50 | 5 | 4 | 4 | 11 |
| 7 | 11 | 7 | 8 |
| 4 | 6 | 5 | 8 |
| 9 | 8 | 10 | 6 |
| 0.001 мг Новокаина 2  Всхожесть: 19/50 | 4 | 3 | 11 | 2 |
| 4 | 9 | 3 | 5 |
| 5 | 3 | 6 | 10 |
| 4 | 8 | 19 | 8 |
| 11 | 11 | 9 | 9 |
| 0.001 мг Новокаина 3  Всхожесть: 17/50 | 12 | 3 | 14 | 9 |
| 1 | 6 | 8 | 6 |
| 6 | 2 | 9 |  |
| 9 | 4 | 7 |  |
| 8 | 9 | 5 |  |
| 0.025 мг Новокаина 1  Всхожесть: 12/50 | 9 | 2 | 2 | 7 |
| 2 | 4 | 3 | 7 |
| 3 | 11 | 1 | 6 |
| 0.025 мг Новокаина 2  Всхожесть: 9/50 | 6 | 6 | 1 |  |
| 2 | 6 | 2 |
| 1 | 9 | 5 |
| 0.025 мг Новокаина 3  Всхожесть: 12/50 | 10 | 5 | 4 | 6 |
| 12 | 5 | 7 | 1 |
| 12 | 4 | 8 | 1 |

Таблица 5. Сравнение средней длины корней по дням наблюдения

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Концентрации (мг)** | **Средняя длина корней** | | |
| 19.10.2020 | 21.10.2020 | 23.10.2020 |
| 0.001 | 3,788889 мм | 8,407443 мм | 10,6067892 мм |
| 0.025 | 3,531746 мм | 5,411111 мм | 5,974074 мм |
| Контроль | 4,30787 мм | 16,96465 мм | 38,33954 мм |