

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО “НАУКОВИЙ ЦЕНТР ПРЕВЕНТИВНОЇ
ТОКСИКОЛОГІЇ, ХАРЧОВОЇ ТА ХІМІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ІМЕНІ АКАДЕМІКА
Л.І. МЕДВЕДЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ”

ЛІСОВСЬКА ВІКТОРІЯ СЕМЕНІВНА

УДК: 616-006:632.95.024.001.3

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ КАНЦЕРОГЕННОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ

14.03.06 – токсикологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державному підприємстві “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України”

Науковий керівник:

доктор медичних наук

Баглій Євген Ананійович,

ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України”, провідний науковий співробітник відділу “Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень ”

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Пихтєєва Олена Гераклітівна,

ДП “Український НДІ медицини транспорту Міністерства охорони здоров’я України”, завідувачка лабораторії промислової і екологічної токсикології відділу гігієни і токсикології

доктор біологічних наук, професор

Гарманчук Людмила Василівна,

ННЦ “Інститут біології та медицини ”, Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, професор кафедри екології та зоології

Захист відбудеться “30” вересня 2020 р. о 14-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.630.01 у ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України” за адресою: 03127, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 6.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України” за адресою: 03127, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 6.

Автореферат розісланий “25” серпня 2020 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат медичних наук

Г. І. Петрашенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у світі впродовж 2018 року було зафіксовано 18,1 млн нових випадків захворювань на рак. В Україні ця цифра сягає 169 817 (WHO, 2019). На думку експертів Міжнародної агенції з вивчення раку (IARC), основною причиною розвитку раку є фактори навколишнього середовища, зокрема пестициди. Особливу увагу щодо небезпеки для людини та довкілля привертає багатотонажне використання впродовж десятиліть хімічних речовин, до яких належать бензімідазоли.

Карбендазим (метил-1Н-бензімідазол-2-іл-карбамат) – один з найпоширеніших представників речовин цього класу, що використовується як фунгіцид для захисту рослин, обробки продукції для довготривалого зберігання, біоцид у лакофарбовій, шкіряній, будівельній і паперовій промисловості, лікарський засіб (Selmanoglu G. et al., 2001; Salahuddin A. et al., 2017; Laryea D., 2010).

Механізм біологічної та фунгіцидної дії карбендазиму полягає у взаємодії з β -тубуліном і пригніченні полімеризації мікротрубочок, що призводить до порушення сегрегації хромосом під час поділу клітин (Vela-Corcia D. et al., 2018). Подібний ефект спостерігається й у клітинах ссавців (Pisani C. et al., 2016; Yenjerla M. et al., 2009).

Стійкість карбендазиму в довкіллі та великі обсяги застосування, що вимірюються десятками тисяч тон, посилюють вірогідність його надходження до організму людини не лише безпосередньо, але й у вигляді залишкових кількостей у вирощеній продукції та забрудненій воді. Тому вивченню токсикологічних властивостей присвячені численні дослідження як у світі (Adedara I.A. et al., 2013; Zhou J. et al., 2015; Bentley K.S. et al., 2000; Kara M. et al., 2019; Jin Y. et al., 2015; Selmanoglu G. et al., 2001; Yu G. et al., 2009), так і в Україні (Проданчук М.Г., Баглій Є.А, Жмілько П.Г. та ін., 2005; Шепельська Н.Р. та ін., 2018). Згідно з результатами цих досліджень встановлено, що карбендазим, попри низьку гостру токсичність, спричиняє гено-, гемато-, гепато-, ембріо- та репродуктивну токсичність, впливає на функцію ендокринної системи. Доведено, що препарат діє як на гормональну чутливість клітин гонад, так і на синтез гормонів (Rama et al., 2014; Kawaratani Y. et al., 2015), що небезпечно розвитком дисгормональної онкопатології.

Як канцероген групи С (можливий канцероген для людини) карбендазим був класифікований ще в 1986 році за результатами кількох хронічних досліджень, згідно з якими в мишей ліній CD-1 і Swiss було виявлене збільшення частоти пухлин печінки; в експериментах на щурах канцерогенність не доведена (McCartoll N.E. et al., 2002). Експерти Агенції з навколишнього середовища США відносять карбендазим до можливих канцерогенів (US EPA, 2018), натомість фахівці з Європейського Союзу не класифікують його як канцероген, а виявлене збільшення частоти пухлин у мишей вважають видоспецифічним і нерелевантним для людини (EFSA, 2010). Нові результати щодо молекулярних механізмів дії карбендазиму (Li Z. et al., 2015; Daundkar P.S. et al., 2014; Helali I. et al., 2016; Spitta L.F., 2018) свідчать про можливість його канцерогенного ефекту. Отже, питання канцерогенності карбендазиму є невирішеним (PPDB, 2019).

З огляду на те, що пестициди на основі карбендазиму широко використовуються в багатьох країнах світу, зокрема в Україні (Перелік пестицидів, 2020), невирішеність проблеми його канцерогенної небезпеки для людини обумовлює актуальність і науково-практичну значущість роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України” за темами: “Наукове обґрунтування методології державної санітарно-гігієнічної експертизи, її нормативно-правового та інформаційного забезпечення” (№ державної реєстрації 0100U000255); “Наукове обґрунтування безпечності для здоров'я людини пестицидів та агрохімікатів, нових технологій, речовин, матеріалів, виробів, об'єктів довкілля, харчових продуктів та продовольчої сировини; розробка відповідних медичних критеріїв і показників (санітарних та епідеміологічних); санітарно-хімічна, токсиколого-гігієнічна оцінка, регламентація, нормування” (№ державної реєстрації 0100U000254, 0112U001133).

Мета дослідження. Визначення особливостей канцерогенної дії карбендазиму та з'ясування можливих механізмів реалізації його онкогенного потенціалу.

Завдання дослідження:

1. Дослідити потенційну канцерогенність карбендазиму в умовах хронічного експерименту на щурах Wistar.
2. Встановити характер змін морфофункціонального стану органів репродуктивної й ендокринної систем щурів.
3. Дослідити вплив карбендазиму на показники крові.
4. Вивчити потенційну канцерогенність карбендазиму в умовах хронічного експерименту на мишах лінії СВА.
5. Дослідити вплив карбендазиму на органи ендокринної та статеві систем ювенільних/передпубертатних щурів-самців у пубертатний період.
6. Вивчити потенційну промоторну властивість карбендазиму в щурів-самців на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”.

Об'єкт дослідження: канцерогенні ефекти карбендазиму та можливі механізми їхньої реалізації.

Предмет дослідження: показники канцерогенної дії карбендазиму в лабораторних тварин (щури, миші) обох статей і різного віку з урахуванням впливу на систему крові, фізіологічні, морфофункціональні та гістоморфологічні зміни в органах ендокринної та статеві систем, вплив на ініційовані гепатоцити.

Методи дослідження: токсикологічні, фізіологічні, патоморфологічні, гістоморфологічні, гематологічні, цитохімічні, гістохімічні, морфометричні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше на підставі експериментальних досліджень генеричного карбендазиму в умовах хронічного, коротко- та середньострокових експериментів отримані нові дані щодо потенційної канцерогенності досліджуваної речовини. Вперше встановлено нелінійне збільшення частоти гормонозалежних пухлин у щурів Wistar: лейдигом у самців;

пухлин гіпофізу, щитоподібної та молочної залоз у самиць - у хронічному експерименті на двох видах лабораторних тварин (щурі, миші), відповідно до вимог OECD 451 та рекомендацій IARC. У мишей лінії СВА вперше виявлена відсутність канцерогенного ефекту карбендазиму. Встановлена здатність речовини проявляти цитотоксичну й анемізуючу дію при надходженні у високих дозах, спричиняти кількісні та морфологічні зміни клітин білої крові, що може свідчити про порушення імунного статусу організму щурів. Уперше виявлена здатність карбендазиму вибірково впливати на органи ендокринної системи ювенільних щурів Wistar у тесті “Пубертатний розвиток і функція щитоподібної залози інтактних ювенільних/передпубертатних щурів самців”: на тлі пригнічення маси тіла тварин знижується маса сім’яників, збільшується маса епідидимісів, проявляються деструктивно-дегенеративні зміни в сім’яниках і епідидимісах, зростає маса гіпофізу та надниркових залоз. Уперше на ювенільних щурах-самцях Wistar показана ендокриндизрапторна дія карбендазиму, обумовлена морфофункціональними та гістоморфологічними порушеннями в гіпофізі, надниркових залозах, епідидимісах і сім’яниках, що є проявом дисгормональних зрушень та причиною ініціації пухлинного процесу. Вперше встановлена промоторна дія речовини на нітрозодietiламін-ініційовані гепатоцити щурів-самців Wistar на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи щодо канцерогенності генеричного карбендазиму використані для оцінки його потенційної небезпеки для людини, при обґрунтуванні гігієнічних нормативів і регламентів безпечного використання препаратів на основі карбендазиму (зокрема Колфуго Супер і Колфуго Дуплет) у сільському господарстві, для вирішення питання щодо їх реєстрації в Україні (висновки від 24.12.2003 р. № 05.03.02-05/370 та № 05.03.02-05/362). Впроваджені в практику ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України” нові підходи до ідентифікації канцерогенності пестицидів-генериків, що порушують гормональний баланс, володіють промоторними властивостями. Вони полягають у використанні методики, призначеної для виявлення ксенобіотиків, що порушують функції ендокринної системи щурів-самців (Guideline 890.1500, US EPA), і тесту щодо вивчення ініціюючих/промоторних властивостей гепатоканцерогенів (модель “НДЕА-гепатектомія”, IARC). Доцільність застосування цих методик полягає у високій інформативності, прискоренні термінів отримання результатів (у 5 разів) і скороченні на порядок кількості лабораторних тварин, що відповідає вимогам біоетики (акти впровадження від 14.02.2013 р. та 03.03.2014 р.). Результати дисертаційної роботи впроваджені в лікувально-діагностичний процес підрозділів токсикологічного профілю Київської міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги, а також у навчальний матеріал кафедри військової токсикології, радіології та медичного захисту Української військово-медичної академії (акти впровадження від 15.11.2019 р. та 05.12.2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Здобувачкою особисто проведений патентно-інформаційний пошук, проаналізована вітчизняна та закордонна література за

темою дисертації, визначені мета та завдання роботи, розроблений дизайн досліджень. Авторкою самостійно проведені та викладені результати експериментальних досліджень. Виконана статистична обробка даних, проаналізовані й узагальнені результати роботи, сформульовані основні висновки, підготовлені до друку наукові публікації за темою дисертації. У дослідженнях канцерогенності карбендазиму в умовах хронічного експерименту патоморфологічні дослідження внутрішніх органів тварин здійснені спільно з науковим співробітником О.В. Решавською та з консультативною допомогою кандидата біологічних наук Н.М. Недопитанської. Гематологічні дослідження за умов гострого та хронічного впливу карбендазиму проведені спільно з кандидатом біологічних наук В.Г. Шуляк і з консультативною допомогою доктора біологічних наук П.Г. Жмійко. Обговорення результатів досліджень, формулювання висновків здійснені разом з науковим керівником.

Апробація матеріалів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися й обговорювалися на: засіданнях Вченої ради ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України” (2003-2019 рр.); І з’їзді токсикологів України (м. Київ, 11-13 жовтня 2001 р.); науково-практичній конференції “Організація токсикологічної допомоги в Україні” (м. Київ, 20-21 травня 2002 р.); 42nd Congress of European Societies of Toxicology (м. Краків, Польща, 11-14 вересня 2005 р.); VIII міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини” (м. Київ, 4-9 червня 2007 р.); International Conference “Tumor and host: novel aspects of old problem” (м. Київ, 21-24 вересня 2010 р.); 11th European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2016) (м. Лімасол, Республіка Кіпр, 24-27 травня 2016 р.); 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) (м. Братислава, Словаччина, 10-13 вересня 2017 р.); 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) “Toxicology – science providing solutions” (м. Гельсінкі, Фінляндія, 8-11 вересня 2019 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковані 17 наукових праць, зокрема 9 статей, 3 з яких у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 6 у фахових наукових виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами даних (Google Scholar, Index Copernicus, PubMed/Medline, SCOPUS), 8 тез доповідей у матеріалах з’їздів, наукових конференцій, зокрема міжнародних.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 170 сторінках комп’ютерного тексту. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Дисертація ілюстрована 18 рисунками, 23 таблицями. Список використаної літератури містить 228 джерел, зокрема 33 – кирилицею, 195 – латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У розділі “Огляд літератури” висвітлені сучасні уявлення про біологічну активність і токсичні властивості пестицидів бензімідазольного ряду, зокрема карбендазиму. Описані особливості впливу на гематологічні та біохімічні показники

крові, репродуктивну, імунну й ендокринну системи, а також гепато-, цито-, генотоксичні та канцерогенні властивості карбендазиму як *in vivo*, так і *in vitro*. Наведені порівняльні дані щодо канцерогенності близьких за будовою сполук групи бензімідазольних фунгіцидів. Проведений аналіз відомих на сьогодні молекулярних механізмів дії карбендазиму та їхнього зв'язку з онкогенезом. Визначені проблеми, що нині вивчені недостатньо. Аналіз літератури дав можливість обґрунтувати актуальність дисертаційної роботи та визначити основні напрямки досліджень.

Матеріали і методи дослідження. У роботі *in vivo* досліджені властивості генеричного 98 % карбендазиму, який за вмістом діючої речовини та токсикологічно значимих домішок відповідав вимогам специфікації ФАО/ВООЗ.

Експериментальна частина дисертаційної роботи проведена на лабораторних тваринах (щери Wistar, миші лінії СВА). Загальна кількість тварин, залучених до експерименту – 1261 (701 щур і 560 мишей). Проаналізовано 20 765 показників.

Усі маніпуляції з тваринами виконані згідно з положеннями “Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (ETS № 123, Страсбург, 18.03.1986 р.), “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Academies Press, USA, 2011), з дотриманням норм Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (№ 27, ст. 230, від 2006 р. зі змінами, внесеними згідно з Законом № 1759-VI (1759-17)). Комісією з етики медичних та біологічних досліджень ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України” (протокол № 6/2 від 02.09.2019 р.) не виявлено порушень морально-етичних норм під час проведення дослідів з тваринами. Експериментальні дослідження виконані з дотриманням стандартних операційних процедур ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України”, розроблених відповідно до рекомендацій і вимог Належної лабораторної практики (GLP).

У роботі використані наступні матеріали та тест-системи досліджень: Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment № 116 Guidance document 116 on the conduct and design of chronic toxicity and carcinogenicity studies, supporting test guidelines 451, 452 and 453 (2nd edition; 2012); OECD Carcinogenicity Studies. Test Guideline 451, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (2009); OECD № 35, Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies (2002); IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human (1980); US Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program, Guideline 890.1500, Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile/Peripubertal Male Rats Assay (2011); Medium-term bioassays for carcinogens. Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification. IARC Scientific Publication. Lyon (1992).

Вивчення канцерогенності карбендазиму проведене в умовах хронічного експерименту за дії доз 0, 5, 25, 75 мг/кг на щурах Wistar обох статей упродовж 104 тижнів, на мишах лінії СВА обох статей протягом 78 тижнів; дослідження впливу на показники периферичної крові за умов одноразової (доза 750 мг/кг ~ 1/2 ЛД₅₀) і хронічної 104-тижневої експозиції на щурах Wistar за дії доз 0, 5, 25, 75 мг/кг;

вивчення ендокриндизрапторної дії на ювенільних щурах Wistar в умовах 30-денного введення у дозах 0, 10, 75 мг/кг; промоторних властивостей на щурах Wistar на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія” за дії доз 0, 25, 75 і 300 мг/кг. Тестову субстанцію вводили внутрішньошлунково за допомогою зонду.

Упродовж дослідження проаналізовані наступні показники: виживаність і смертність тварин, маса та приріст маси тіла, маса органів, макроскопічні та гістоморфологічні показники (непухлинна патологія, переднеопластичні, неопластичні зміни), частота пухлин і їхній латентний період, коефіцієнт множинності пухлин, ступінь малігнізації, гемо- та лейкограма, цитохімічні та морфологічні показники клітин крові, параметри статевого дозрівання, кількість і площа гіперпластичних гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ)-позитивних вузликів.

Зразки органів і тканин для гістоморфологічних досліджень готували за загальноприйнятими методами та фарбували гематоксиліном і еозином (Горальський Л.П., 2015). Гематологічні дослідження виконували за допомогою уніфікованих методів (Меньшиков В.В., 1987). Вивчення активності пероксидази (КФ 1.11.1.7.) у нейтрофілах проводили за методом Loele (1960); хлорацетат-естерази (КФ 3.1.1.2) – Moloney et al. (1960); вмісту ліпідів – Askerman (1969). Виявлення маркерного ферменту ГГТ (КФ 2.3.2.2) на кріостатних зрізах печінки проводили методом азосполучення (Лойда З. та ін., 1982). Гістологічні препарати та мазки крові аналізували за допомогою мікроскопа Axioskop (Germany), реєстрацію й обробку графічних зображень для морфометричних досліджень проводили за допомогою Epson Perfection Scan V750 і Pro Adobe Photoshop CS6.

Отримані дані обробляли з використанням стандартного ліцензійного пакета програмного забезпечення Microsoft® Office Excel 2010, Statistica 6.0. Застосовувалися параметричні та непараметричні методи статистики. Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали, використовуючи критерії Стюдента, Манна Уїтні, χ^2 з поправкою Йейтса, однобічного точного критерію Фішера, Кокс-Мантел тесту.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження канцерогенності карбендазиму в умовах хронічного експерименту. Щури. Карбендазим при пероральному 104-тижневому введенні щурам-самцям у дозі 75 мг/кг спричиняв достовірне зниження маси тіла до 42-го тижня першого року експерименту, наприкінці дослідження маса тіла тварин була зменшена недостовірно (на 6 %; $p \geq 0,05$). Смертність піддослідних щурів упродовж експерименту не підвищувалася за впливу карбендазиму порівняно з інтактним контролем і була обумовлена інтеркурентними захворюваннями.

Під час патологоанатомічного дослідження загиблих упродовж експерименту та після планової евтаназії тварин були виявлені специфічні патологічні зміни, пов'язані з дією карбендазиму. При макроскопічному дослідженні було встановлене зростання частоти випадків атрофії сім'яників: 2/70, 2/70, 3/70 і 6/70 випадків у дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг відповідно. Гістоморфологічно в сім'яниках спостерігалися деструктивно-атрофічні зміни (рис. 1), що були дозо-залежними та достовірно збільшеними в щурів, які отримували карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг (на 30 % і 44 % відповідно, 9 % у контролі). Інша непухлинна патологія в піддослідних і контрольних тварин була однотипною.

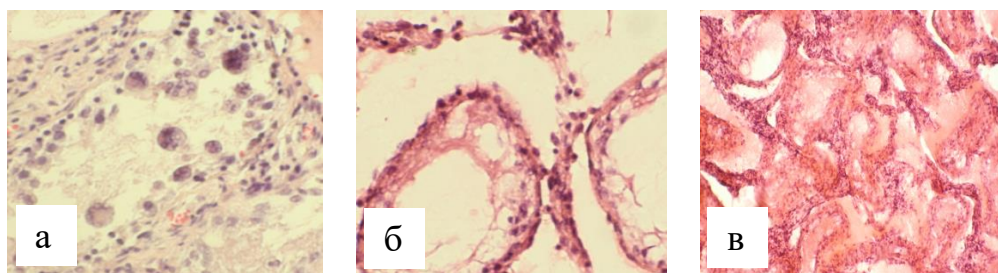


Рис. 1. Непухлинна патологія та переднеопластичні зміни в сім'яниках щурів Wistar. Вплив карбендазіму в дозах: 25 мг/кг – дегенеративні багатоядерні клітини в просвіті сім'яних канальців (а); 75 мг/кг – атрофія епітелію сім'яних канальців (б); 75 мг/кг – лейдигоклітинна гіперплазія (в). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 400$ (а, б), $\times 100$ (в).

Упродовж експерименту були виявлені пухлини в щитоподібній залозі (62), молочній залозі (43), гіпофізі (31), сім'яниках (16), наднирникових залозах (10), печінці (8), яєчниках (5), матці (4), легенях (3), мозку (1), гардеровій залозі (1), стравоході (1), підшлунковій залозі (1), а також в органах гемопоетичної системи (19), м'яких тканинах (7) і шкірі (3). Спектр пухлин у щурів як контрольної, так і піддослідних груп був характерним для даного виду тварин. Найчастіше пухлини спостерігалися в самців ($p \geq 0,05$) і самиць ($p \leq 0,05$) за дії карбендазіму в дозах 5 і 25 мг/кг (рис. 2а). Між частотою злоякісних пухлин у піддослідних і контрольних тварин не було встановлено статистично достовірної різниці ($p \geq 0,05$). Коефіцієнт множинності пухлин у щурів піддослідних і контрольної груп не відрізнявся. Загальна кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних. Середня тривалість життя (СТЖ) всіх тварин у групі та тварин з пухлинами, які отримували карбендазім, не відрізнялася від контрольних. Час виявлення першої пухлини та термін середнього латентного періоду розвитку пухлини були зіставними в піддослідних і контрольній групах.

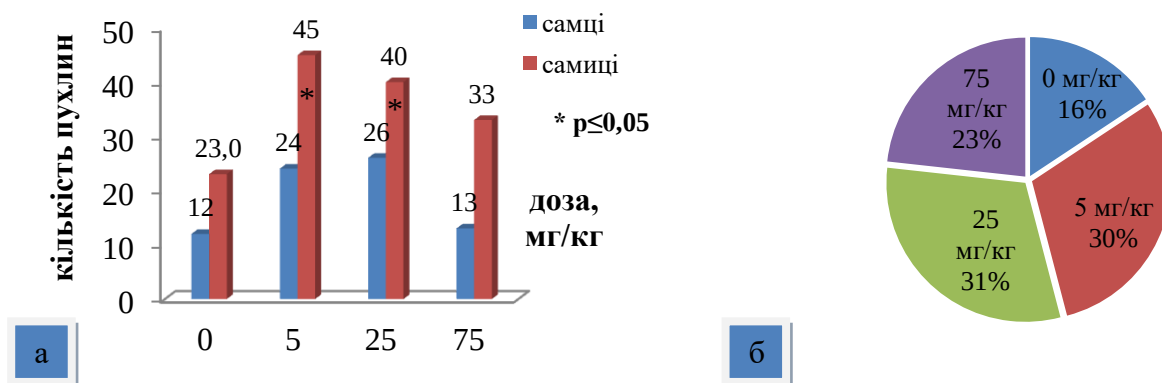


Рис. 2. Загальна кількість пухлин у щурів Wistar в умовах хронічного експерименту залежно від статі тварин (а); загальна частота гормонозалежних пухлин залежно від дози (б).

Поміж новоутворень переважали гормонозалежні пухлини. Їхня частота була вищою у тварин усіх піддослідних груп порівняно з контролем (рис. 2б). Залежно від дози (0, 5, 25 і 75 мг/кг) у самців частота зазначених пухлин становила 10/60,

15/60, 21/60, 10/60; частота інших новоутворень – 2/60; 9/60; 5/60 і 3/60 відповідно; в самиць – 17/60, 37/60, 32/60, 30/60; інших новоутворень – 6/60; 8/60; 8/60 і 3/60 відповідно.

Був проведений уточнюючий аналіз канцерогенного ефекту карбендазиму за пухлинами, частота яких була найбільшою: пухлини щитоподібної залози, молочної залози, гіпофізу та сім'яників.

Серед новоутворень щитоподібної залози діагностували папілярні, поліморфнофолікулярні, солідні аденоми, а також поліморфнофолікулярні та солідні аденокарциноми (рис. 3). Частота цих пухлин у самиць, які отримували карбендазим в дозі 5 мг/кг, без урахування інтеркурентної смертності, була достовірно збільшеною при попарному порівнянні з контролем ($p=0,045$) за рахунок аденом ($p<0,05$) (рис. 4). Позитивного тренду з дозою за виникненням аденом щитоподібної залози (тренд Peto) виявлено не було ($p=0,4$).

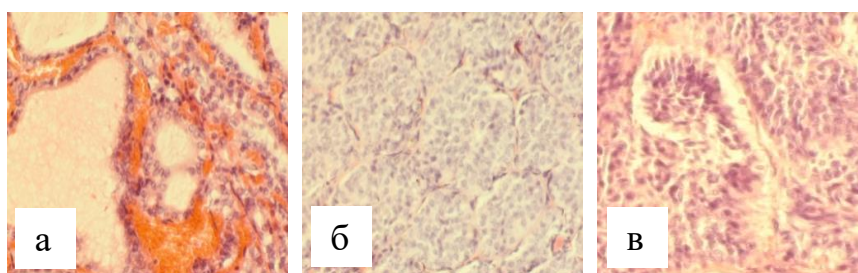


Рис. 3. Пухлини щитоподібної залози щурів Wistar. Вплив карбендазиму у дозах: 5 мг/кг – поліморфнофолікулярна аденома (а); 5 мг/кг - солідна аденома (б); 25 мг/кг – солідна аденокарцинома (в). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$.

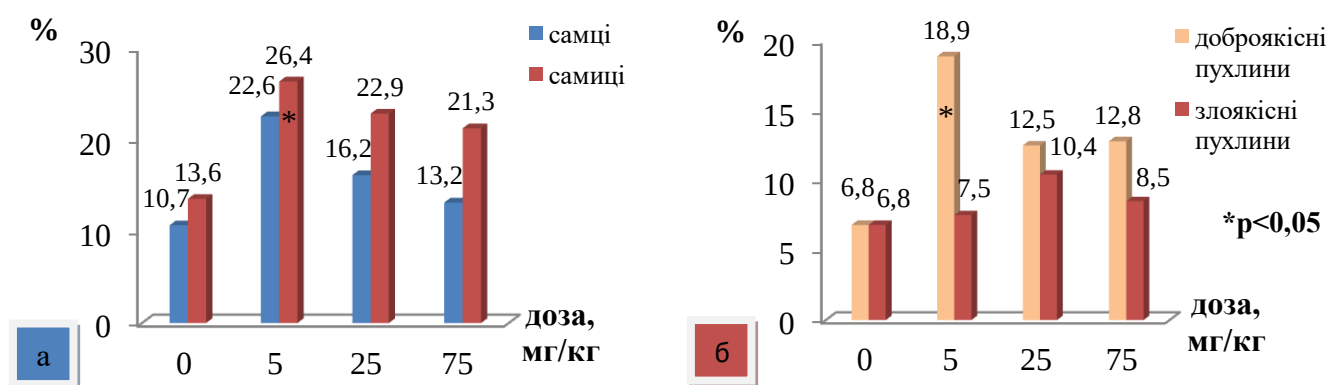


Рис. 4. Частота пухлин щитоподібної залози щурів Wistar у хронічному експерименті. Співвідношення частоти пухлин залежно від статі тварин (а); доброякісні/злоякісні пухлини щитоподібної залози у щурів-самиць (б).

Новоутворення молочної залози були переважно представлені фіброаденомами (рис. 5а) і складали 79 % від загальної кількості пухлин даної локалізації (34 з 43 виявлених). Інші доброякісні та злоякісні пухлини (аденоми, внутрішньопротокові папіломи, фіброми, фібросаркоми і внутрішньопротокові карциноми) зустрічалися поодинокі. Достовірне збільшення частоти новоутворень даної локалізації за рахунок збільшення фіброаденом ($p>0,05$) було встановлене у

тварин, які отримували мінімальну та середню дози карбендазиму ($p < 0,05$). Залежність частоти пухлин від дози виявлена не була (рис. 5б).

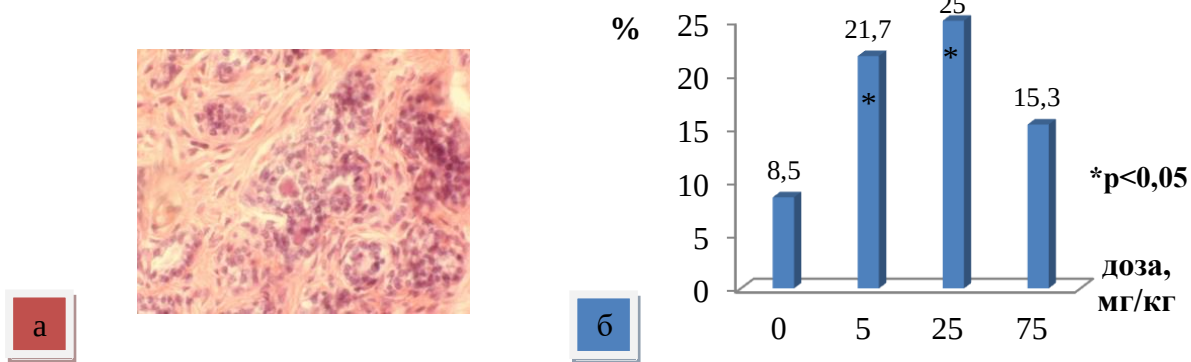


Рис. 5. Фіброаденома молочної залози, вплив карбендазиму у дозі 5 мг/кг (а); забарвлення гематоксилін та еозин; х 200. Частота пухлин молочної залози щурів Wistar у хронічному експерименті (б).

З-поміж новоутворень гіпофізу були діагностовані геморагічні аденоми й аденокарциноми (одна метастазуюча) (рис. 6). Достовірне збільшення частоти пухлин даної локалізації ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем за рахунок аденом ($p < 0,05$) спостерігалось в самиць за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг (рис. 7). Позитивний тренд з дозою був статистично достовірним ($p = 0,04$).

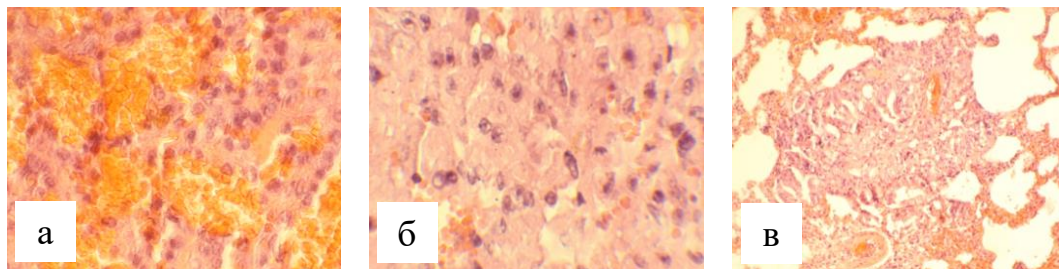


Рис. 6. Пухлини гіпофізу щурів Wistar. Вплив карбендазиму в дозах: 75 мг/кг – геморагічна аденома (а); 25 мг/кг - аденокарцинома гіпофізу (б) з метастазами в легенях (в). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 400$ (а), $\times 600$ (б), $\times 100$ (в).

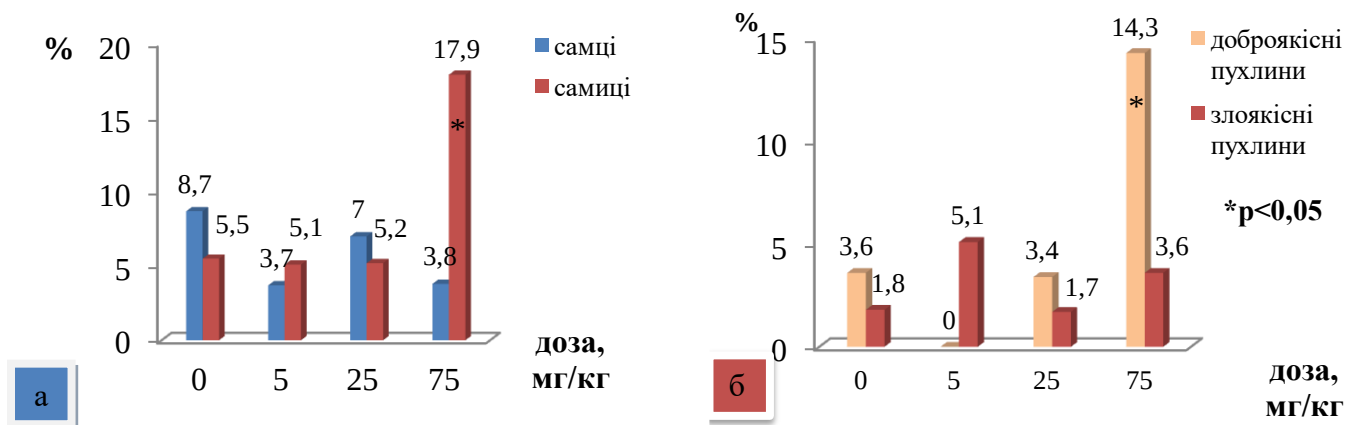


Рис. 7. Частота пухлин гіпофізу щурів Wistar у хронічному експерименті. Співвідношення частоти пухлин залежно від статі тварин (а); співвідношення доброякісні/злоякісні пухлини гіпофізу у щурів-самиць (б).

Пухлини сім'яників у експерименті були представлені лейдигомами (рис. 8а), частота яких без урахування інтеркурентної смертності була достовірно збільшеною ($p=0,02$) при попарному порівнянні з контролем у тварин, які отримували карбендазиму у дозі 25 мг/кг (рис. 8б), з достовірним позитивним трендом з дозою ($p=0,03$).

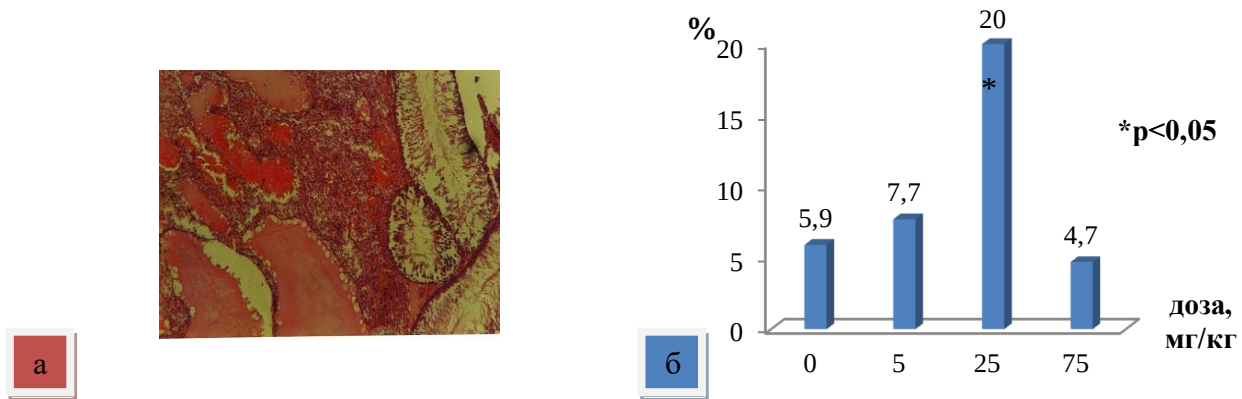


Рис. 8. Лейдигома, вплив карбендазиму у дозі 25 мг/кг (а); забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$. Частота пухлин сім'яників щурів Wistar у хронічному експерименті (б).

Отже, за результатами аналізу непухлинної патології було з'ясовано, що вплив карбендазиму в дозах 25 і 75 мг/кг на організм щурів-самців спричиняв деструктивно-атрофічні та переднеопластичні зміни в сім'яниках. Щодо пухлинної патології, то наведені дані разом зі збільшенням частоти пухлин демонстрували відсутність залежності “доза-ефект”, що не дозволяє дійти висновку про пряму канцерогенну дію карбендазиму. Отримані результати за сумарною частотою дисгормональних новоутворень у самців вказують на їхнє максимальне збільшення при дії середньої дози, тоді як у самиць простежується зворотна залежність від дози. За пухлинами іншої локалізації в самців була відмічена тенденція до зменшення частоти зі зростанням дози, у самиць – без чітких залежностей. Отже, такі різноспрямовані та дещо парадоксальні залежності ефекту від дози можуть свідчити про опосередкований онкогенний ефект карбендазиму, враховуючи дисгормональний тип пухлин, через ендокринну систему. Зменшення частоти індукованих пухлин за дії карбендазиму в максимальній дозі 75 мг/кг можна пов'язати з його встановленими антипроліферативними та, відповідно, протипухлинними властивостями, а саме цитотоксичністю й апоптозом, що проявляються на рівні високих доз (Нао D. et al., 2002).

Миші. У хронічному експерименті достовірно збільшувалась смертність мишей за рахунок інтеркурентних захворювань наприкінці експозиції в групі самців за дії мінімальної та середньої доз, самиць – максимальної дози без клінічних проявів інтоксикації. Під час патологоанатомічного та гістоморфологічного досліджень специфічних змін, пов'язаних з дією карбендазиму, встановлено не було. Пухлини були виявлені в печінці (15), легенях (8), молочній залозі (5), матці (3), яєчниках (3) і органах гемопоетичної системи (3), що за гістоморфологічним спектром і локалізацією характерні для даного виду та лінії мишей: серед пухлин печінки та легень – аденоми і аденокарциноми; в молочній залозі – аденокарциноми;

матці – аденома, аденокарцинома, саркома; яєчниках – гранульозоклітинні пухлини та текома, гемопоетичній системі – лімфосаркоми. Під час статистичного аналізу не встановлені збільшення частоти пухлин у мишей піддослідних груп порівняно з контролем, скорочення латентного періоду пухлин та СТЖ мишей з пухлинами.

Таким чином, в умовах проведеного експерименту частота виявлених пухлин, їхня гістоструктура, локалізація та латентний період у піддослідних мишей, які отримували карбендазиму у дозах 5, 25 або 75 мг/кг, не відрізнялись від показників контрольних тварин.

Вплив карбендазиму на показники крові щурів Wistar. Гостра інтоксикація. За одноразового впливу карбендазиму в дозі 750 мг/кг на початку експерименту (1 і 3-тя доба) була виявлена ретикулоцитопенія (49 % і 51 % відповідно; $p \leq 0,05$), на 7-му добу еритроцитопенія (8 %; $p \geq 0,05$) і упродовж експерименту – акантоцитоз. Незважаючи на поліхроматофілію та ретикулоцитоз, кількість еритроцитів і рівень гемоглобіну в крові щурів наприкінці експерименту (14 і 21-ша доба) були достовірно зниженими на 18 % і 10 % відповідно ($p \leq 0,05$), що є свідченням анемізуючої дії карбендазиму. Наявність акантоцитів за гострого впливу карбендазиму може свідчити про цитотоксичність і анемізуючий ефект речовини, обумовлений порушенням структури і функції мембран еритроцитів. Ймовірною причиною тромбоцитопенії (31 %; $p \leq 0,05$), виявленої на 21-шу добу експерименту, було пригнічення мегакаріоцитарного диференціювання та проліферації, що потребує подальших досліджень. Встановлені на 3-тю добу експерименту лейко- і нейтрофілоцитопенія (27 % і 66 % відповідно; $p \leq 0,05$), збільшення кількості клітин лейколізу (на 100 %, $p \leq 0,05$) були ознакою токсичного впливу карбендазиму на лейкоцити та, зокрема, нейтрофільні гранулоцити. Надалі гранулоцитопоез відновлювався, що було підтверджено цитохімічними дослідженнями.

Отже, вплив карбендазиму на периферичну кров щурів на рівні дози 750 мг/кг свідчив про його цитотоксичність та анемізуючий ефект, що було продемонстровано іншими дослідниками (Talal A. Zari et al., 2011; Ashby J., 2001).

Хронічна інтоксикація. В умовах хронічного впливу карбендазиму на організм щурів самців та самиць у дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг упродовж 104 тижневої експозиції чіткої залежності “доза-час-ефект” з боку клітин як червоної, так і білої крові не спостерігалась. Виявлені морфологічні зміни в еритроцитах, а саме анізоцитоз, акантоцитоз і поліхроматофілія, були свідченням слабого анемізуючого ефекту, що має прихований характер. Зниження в окремі терміни дослідження кількості базофілів (до 100 %), еозинофілів (на 60-90 %), паличкоядерних нейтрофілів (до 100 %), а також наявність у судинному руслі макрофагів і морфологічно змінених клітин білої крові (лімфоцитів, нейтрофілів, моноцитів) можуть свідчити про порушення імунного статусу та, відповідно, пригнічення протипухлинного захисту організму.

Вплив карбендазиму на ендокринну систему і розвиток ювенільних щурів-самців Wistar. Результати дослідження впливу карбендазиму на самців щурів Wistar у пубертантний період свідчили про відсутність впливу за дії мінімальної дози (10 мг/кг), тим часом як за умови дії максимальної дози (75 мг/кг)

спостерігалось зниження маси і приросту маси тіла тварин (до 10 % і 28 %) упродовж експерименту, а також на момент статевого дозрівання (до 10 %) ($p \leq 0,05$). Виявлено збільшення абсолютної та відносної маси гіпофізу (на 49 і 62 %), надниркових залоз (на 9 і 19 %), абсолютної маси епідидимісів (на 17/19 %) при зменшенні маси сім'яників (на 28/30 %) ($p \leq 0,05$). Крім цього, була встановлена достовірна кореляція між змінами маси “гіпофіз-сім'яники” та “гіпофіз-надниркові залози” з коефіцієнтом кореляції 0,71 і 0,79 та 0,77 і 0,65 відповідно ($p \leq 0,05$). За результатами гістоморфологічних досліджень у тварин цієї групи були діагностовані деструктивно-атрофічні зміни в сім'яниках та епідидимісах (рис. 9).

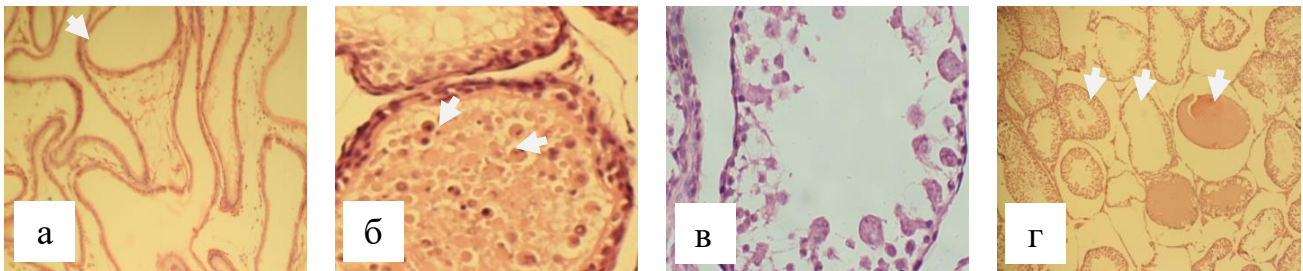


Рис. 9. Гістоморфологічні зміни в епідидимісах і сім'яниках ювенільних щурів Wistar. Вплив карбендазіму в дозі 75 мг/кг – дегенеративні зміни епітелію каналців епідидиміса та відсутність сперми (а); клітинний детрит у просвіті каналців епідидиміса (б); дегенеративно-атрофічні зміни епітелію сім'яних каналців (в); десквамація клітин, зменшення рядності, атрофія та некроз сперматогенного епітелію (г). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 100$ (а, г), $\times 400$ (б, в).

Таким чином, отримані результати щодо морфофункціональних і гістоморфологічних змін в органах ендокринної та статеві системи є свідченням того, що карбендазім у дозі 75 мг/кг спричиняє порушення гомеостазу андрогенів, а саме виявлені деструктивні зміни в сім'яниках стимулюють синтез гормонів у надниркових залозах за активації гіпофізу. Подібний алгоритм підтверджується даними інших дослідників на дорослих тваринах (Creasy D., 2008). Водночас статистично значуще збільшення загальної кількості пухлин, частоти пухлин щитоподібної та молочної залоз щурів-самиць за дії карбендазіму в дозах 5 і 25 мг/кг, частоти лейдигом щурів-самців у дозі 25 мг/кг за відсутності цих ефектів у дозі 75 мг/кг демонструвало можливість модуляції карбендазімом спонтанного онкогенезу через опосередкований механізм впливу на функцію ендокринної системи. Стимуляція розвитку цих пухлин може здійснюватися кількома механізмами. У самців шляхом пошкодження сім'яників і зниження синтезу тестостерону, відповідного підвищення активності аденогіпофізу, що призводить до напруження осей “гіпофіз-наднирники” та “гіпофіз-гонади”, компенсаторної проліферації клітин Лейдига та, відповідно, утворення пухлин (Cook J.C. et al., 1999). Карбендазім у високих дозах проявляє антипроліферативні властивості та не сприяє утворенню пухлин у сім'яниках. У самиць виникнення пухлин гіпофізу та молочної залози може відбуватися за рахунок блокування збірки мікротрубочок цитоскелета та відповідних цитодинамічних змін. Останні порушують взаємодію гормонів з рецепторами та транспортування їхніх комплексів у клітинах, що впливає на сигнальні системи та гормональний гомеостаз, як наслідок – підвищення

компенсаторної проліферації клітин, зокрема гіпофізу (Cote M. et al., 1997; Manavathi B. et al., 2006; Dave R.H. et al., 2009). Саме такий механізм за впливу низьких концентрацій беномілу та карбендазиму показаний на культурі клітин людини: індукція ароматази спричиняє гіперестрогенезацію, що може призвести до виникнення пухлин молочної залози (Morinaga H., 2004; Knower K.C. et al., 2014).

Основним в механізмі виникнення пухлин щитоподібної залози в щурів є стимуляція секреції тиреостимулюючого гормону через зниження концентрації тироксину або трийодтироніну. Період напіврозпаду цих гормонів порівняно з людиною значно коротший, тому цей механізм є видоспецифічним для щурів (Swenberg J A. et al., 1992). У проведеному нами дослідженні не було виявлене збільшення випадків гіпертрофій і гіперплазій щитоподібної залози в щурів за дії карбендазиму, що не дозволяло однозначно пов'язати встановлене підвищення частоти пухлин з дією досліджуваної речовини. Водночас більшість пухлин даної локалізації була відзначена на термінальному етапі експерименту без статистично значущого тренду з дозою, на відміну від лейдигом. Тому виявлений ефект може бути віднесений до випадкових.

Промоторні властивості карбендазиму. Кількість ГТТ-позитивних вузликів трансформованих гепатоцитів, виявлених за експресією раково-ембріонального ферменту в ініційованих нітрозодиметиламіном і частковою гепатектомією гепатоцитах у щурів-самців Wistar на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”, статистично значуще зростала лише за дії препарату в середній дозі 75 мг/кг. Площа цих вузликів достовірно не змінювалася порівняно з негативним контролем і була меншою, ніж у позитивному контролі (фенобарбітал, 37,5 мг/кг) (рис. 10).

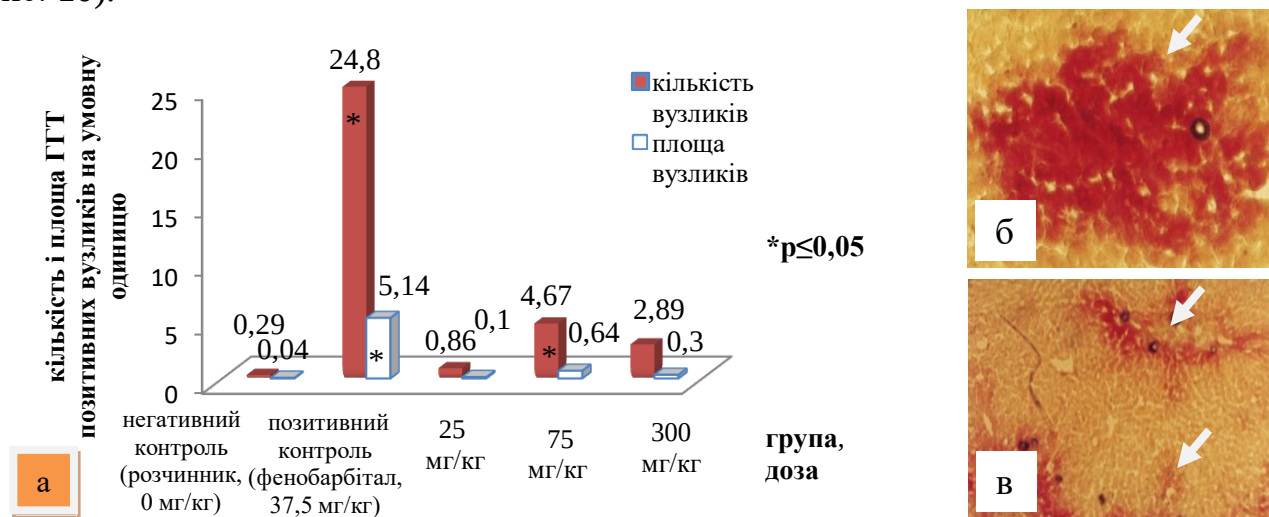


Рис. 10. Кількість і площа ГТТ-позитивних вузликів у тканині печінки (а). ГТТ вузлики за дії фенобарбіталу (позитивний контроль) (б); за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг (в); гістохімічна реакція, метод азосполучення; x400 (а), x200 (в).

Збільшення кількості гіперпластичних вузликів без змін їхньої площі, встановлене в щурів за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг, свідчить про його слабку промоторну властивість. Водночас відсутність достовірного промоторного ефекту за

дії карбендазиму в дозі 300 мг/кг, ймовірно, обумовлена його цитотоксичністю в цій дозі.

Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти висновку, що карбендазим може діяти через епігенетичний механізм як промотор трансформації клітин, так і безпосередньо як інгібітор проліферації клітин, блокуючи мітоз та індукуючи апоптоз. Співвідношення вкладу того чи іншого механізму, на наш погляд, пояснює порушення залежності “доза-ефект” в онкогенезі.

Згідно з сучасними рекомендаціями IARC щодо оцінки канцерогенної небезпеки ксенобіотиків для людини за результатами досліджень на експериментальних тваринах (IARC, 2019), отримані дані канцерогенності карбендазиму для щурів не можуть вважатись достатніми доказами його канцерогенності для людини: виявлені пухлини були переважно доброякісними; локалізація та гістоморфологічний тип новоутворень характерними для спонтанного онкогенезу щурів Wistar; коефіцієнт множинності та латентний період розвитку пухлин у піддослідних і контрольній групах суттєво не відрізнялися. Встановлені в проведеному дослідженні ефекти карбендазиму мають токсикологічне значення для людини, зокрема як показники ендокриндизрапторної дії, що узгодженні з даними літератури (Mnif W. et al., 2011; K.A. Keane et al., 2015).

На наш погляд, генотоксичні ефекти карбендазиму, що виявлені в культурі клітин на рівні низьких доз (Kara M. et. al., 2019), не реалізуються *in vivo* при його хронічному надходженні до організму тварин через супутню цитотоксичність.

Отже, карбендазим в експериментах *in vivo* на лабораторних тваринах проявив слабкий онкогенний ефект і продемонстрував ендокриндизрапторні властивості, релевантність яких не виключена для людини. NOAEL щодо канцерогенності карбендазиму рекомендована на рівні 5 мг/кг. Добова допустима доза для людини в Україні затверджена на рівні 0,01 мг/кг, отже, враховує всі виявлені ефекти карбендазиму.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на підставі експериментальних досліджень ідентифікована канцерогенна активність генеричного карбендазиму, визначені гістоморфологічний спектр пухлин, особливості канцерогенного потенціалу у тварин, видові відмінності, з'ясовані можливі механізми канцерогенної дії в щурів шляхом впливу на ендокринну систему та промоцію, надана характеристика гістоморфологічних і морфофункціональних змін ендокринних органів за впливу карбендазиму на щурів передпубертатного віку.

1. Надходження карбендазиму в дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла до організму щурів Wistar упродовж 104 тижневої експозиції спричиняє в щурів-самиць статистично достовірне збільшення частоти пухлин щитоподібної залози за дії дози 5 мг/кг (на 26,4 %) порівно з контролем (13,6 %), молочної залози за дії доз 5 і 25 мг/кг (на 21,7 % і 25 % відповідно) порівно з контролем (8,5 %), гіпофізу за дії дози 75 мг/кг (на 17,9 %) порівняно з контролем (5,5 %); у щурів-самців збільшення частоти лейдигоклітинних пухлин за дії дози 25 мг/кг (на 20 %) порівняно з контролем (5,9 %). У щурів-самців спостерігались однонаправлені непухлинні

деструктивно-дистрофічні та передпухлинні гіперпластичні стани в сім'яниках, частота яких була статистично значущою за дії речовини в дозах 25 і 75 мг/кг (30 % і 44 % порівняно з контролем (9 %)). Отримані кількісні показники свідчать про онкогенний потенціал карбендазиму, що може бути охарактеризований як слабкий опосередкований, враховуючи дисгормональний тип пухлин, через ендокринну систему.

2. Вплив карбендазиму на периферичну кров щурів за умов гострої інтоксикації у дозі 750 мг/кг обмежується цитотоксичністю, про що свідчать зменшення кількості формених елементів крові, морфологічні зміни лейкоцитів і еритроцитів, та анемізуючим ефектом. В умовах хронічного експерименту карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг проявляє слабкий анемізуючий ефект, що має прихований характер.

3. Дія карбендазиму в дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла на організм мишей лінії СВА самців та самиць упродовж 78-тижневої експозиції не призводить до змін частоти пухлин і латентного періоду, отже, карбендазим в умовах проведеного експерименту не проявляє канцерогенного ефекту в мишей.

4. Виявлений вплив карбендазиму в умовах хронічного експерименту на ендокринну систему дорослих щурів Wistar за критеріями частоти пухлин щитоподібної залози, молочної залози, гіпофізу і сім'яників (зокрема непухлинної патології) підтверджений пошкоджуючою дією речовини на морфофункціональні показники ендокринних і статевих органів у ювенільних щурів.

5. За дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг на щурів-самців у пубертатний період встановлені вірогідне збільшення абсолютної і відносної маси гіпофізу (на 49 % і 62 % відповідно), наднирникових залоз (на 9 % і 19 %), абсолютної маси епідидимісів (на 17/19 %), зниження абсолютної маси сім'яників (на 28/30 %), гістопатологічні порушення у вигляді деструктивно-атрофічних змін у епідидимісах і сім'яниках. Дані щодо властивостей карбендазиму як ендокринного дизраптора свідчать про можливість реалізації його онкогенного потенціалу через вплив на ендокринну систему.

6. Вплив карбендазиму в дозі 75 мг/кг на ініційовані нітрозодietiламіном гепатоцити щурів призводить до експресії гамма-глутамілтрансферази, що проявляється статистично значущим зростанням кількості гамма-глутамілтрансфераза-позитивних вузликів ($4,67/\text{см}^2$ проти $0,29/\text{см}^2$ у контролі) й є свідченням промоторної дії речовини в цій дозі. Виявлений ефект вказує на можливість реалізації онкогенного потенціалу карбендазиму через механізм промоції.

7. Відпрацьовані та впровадженні під час виконання дослідження методики з визначення порушень функції ендокринної системи самців (Guideline 890.1500, US EPA) і промоторної активності гепатоканцерогенів (модель "НДЕА-гепатектомія", IARC) запропоновані для використання в низці альтернативних тестів з ідентифікації канцерогенності генеричних пестицидів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Лісовська В.С.**, Недопитанська Н.М., Решавська О.В. Добір гістохімічних маркерів передпухлинних пошкоджень печінки білих нелінійних щурів. *Современные проблемы токсикологии*. 2000. №5. С. 3–8. (Експериментально-методична стаття - дисертанткою проведені аналіз літератури, гістоморфологічні і гістохімічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).
2. Баглей Е.А., Недопитанская Н.М., Решавская О.В., **Лисовская В.С.** Идентификация канцерогенности технических продуктов пестицидов- генериков с помощью кратко- и среднесрочных тестов. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*. 2014. №3-4. С. 32–37. (Проблемна стаття - дисертанткою проведений аналіз літератури).
3. Баглей Е.А., **Лисовская В.С.**, Недопитанская Н.М. Особенности влияния карбендазима на эндокринную систему и пубертантное развитие крыс самцов. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*. 2015. №3(71). С. 34–47. (Дисертанткою проведені фізіологічні, патоморфологічні, гістоморфологічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).

Статті у наукових фахових виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз:

4. **Лісовська В.С.**, Недопитанська Н.М., Решавська О.В., Терещенко Н.В., Баглій Є.А. Ідентифікація канцерогенності карбендазиму: експериментальне дослідження на мишах лінії СВА. *Український журнал сучасних проблем токсикології*. 2019. №3(87). С. 18–23 (Дисертанткою проведені патоморфологічні і гістоморфологічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).
5. **Лісовська В.С.**, Жмінко П.Г., Шуляк В.Г. Оцінка токсичного впливу карбендазиму на систему крові щурів за умов гострої пероральної інтоксикації. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018. №2 (144). С. 117–122. (Дисертанткою проведені гематологічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).
6. **Лисовская В.С.**, Жминько П.Г., Шуляк В.Г. Влияние карбендазима на систему крови крыс в условиях хронической пероральной интоксикации. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. №2. Т. 1(150). С. 152–156. (Дисертанткою проведені гематологічні дослідження, аналіз отриманих даних, написання й оформлення статті).
7. **Лісовська В.С.** Експресія гамма-глутамілтрансферази у гепатоцитах щурів за дії генеричного карбендазиму на моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА-гепатектомія». *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. №4. Т. 2(154). С. 130–135. (Дисертанткою проведені патоморфологічні дослідження, гістотехнічна і гістохімічна обробка

зразків, ініціація гепатоцитів, гепатектомія, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).

8. **Лісовська В.С.**, Недопитанська Н.М., Решавська О.В., Баглій Є.А. Канцерогенність карбендазиму: дослідження у хронічному експерименті на щурах Wistar. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. №1 (155). С.321-328. (Дисертанткою проведені патоморфологічні, гістоморфологічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).

9. Omelchuk Serhii, Syrota Alina, Vavrinevych Olena, Blagaia Anna, **Lisovska Viktoriia**, Reshavska Olena. Experimental study on the carcinogenic effects of pesticides with ascertained carcinogenic activity under the conditions of its simultaneous influence on the organism of laboratory animals. *Wiadomości lekarskie* (Warsaw, Poland). 2018. №7. Т. LXXI. С. 1274-1281 (Експериментально-методична стаття - дисертанткою проведені гістоморфологічні та гістохімічні дослідження).

Матеріали та тези науково-практичних конференцій:

10. **Лісовська В.С.** Морфологічні зміни в органах репродуктивної системи самців-щурів при дії карбендазиму: матеріали І з'їзду Токсикологів України 11-13 жовтня. 2001. С. 46-47.

11. **Лісовська В.С.** Патоморфологічна характеристика пухлин щитовидної залози білих нелінійних щурів: матеріали науково-практичної конференції “Організація токсикологічної допомоги в Україні” (20-21 травня 2002). Київ. 2002. С. 115–116.

12. **Lisovska V.**, Shulyak V., Nedoputanska N. Carbendazim administration to the blood system of rats. Abstracts of the 42nd Congress of the European Societies of Toxicology. Cracow, Poland 11th -14th of September. 2005. S. 141.

13. Баглій Є.А., Недопитанська Н.М., **Лісовська В.С.**, Решавська О.В. Використання моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА - часткова гепатектомія” для визначення канцерогенної небезпеки пестицидів: матеріали VIII міжнародної науково-практичної конференції “Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини”. 2007. С. 28-29.

14. Bagley E. Reshavska E, Nedopitanska N., **Lisovska V.** Tumor promotion activity of pesticides. *Experimental oncology*. Abstracts of the international conference «Tumor and host: novel aspects of old problem». Kyiv, Ukraine 21-24 of September. 2010, V. 32. P. 73-74.

15. **Lisovska V.** Pesticide carbendazim as suspected endocrine disruptor on male rats pubertal development. Programme & book of abstracts 11 th European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2016). Limassol, Cyprus. 24 th - 27 th May. 2016. P. 201.

16. **Lisovska V.**, Nedopytanska N., Bagley E., Reshavska E. Endocrine disruption and carcinogenesis: Evaluation of neoplasms in endocrine organs of rats in Carbendazim carcinogenic chronic study [Electronic resource]. Abstracts of the 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) 10th–13th September, Bratislava, Slovakia. 2017. URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.467> .

17. **Lisovska V.**, Bagley E., Nedopytanska N. Expression of γ - Glutamyltransferase in rats' hepatocytes after carbendazim exposure. Abstracts of the 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) Toxicology – Scienceprovidingsolutions. Helsinki, Finland 8th –11th of September. 2019. S. 135-136.

АНОТАЦІЯ

Лісовська В.С. Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.06 “Токсикологія”. – ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України”, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена вивченню потенційної канцерогенності фунгіциду карбендазиму та з’ясуванню можливих механізмів реалізації цього ефекту. Поряд з класичними хронічними експериментами щодо вивчення канцерогенної активності на щурах і мишах обох статей досліджені промоторний ефект карбендазиму, вплив на систему крові, органи ендокринної та статеві системи ювенільних щурів-самців тощо.

Встановлене підвищення загальної частоти пухлин у щурів-самиць за рахунок пухлин щитоподібної та молочної залоз, гіпофізу в умовах хронічного експерименту. У самців виявлені непухлинні деструктивно-дистрофічні, передпухлинні гіперпластичні зміни та збільшення частоти пухлин сім’яників. Вплив карбендазиму на ендокринну систему дорослих щурів Wistar в умовах хронічного експерименту підтверджений пошкоджуючою дією на морфофункціональні показники ендокринних і статевих органів ювенільних щурів. Не виявлені канцерогенні властивості карбендазиму в мишей лінії СВА. Встановлені цитотоксична дія й анемізуючий ефект карбендазиму на периферичну кров щурів на рівні високих доз. Виявлена здатність карбендазиму збільшувати кількість гамма-глутамілтрансфераза-позитивних вузликів у печінці щурів.

Отже, карбендазим в експериментах *in vivo* на щурах Wistar проявляє слабкий онкогенний ефект з можливістю реалізації як опосередковано через ендокринну систему, так і через механізм промоції. Використані в дослідженні методики з визначення порушень функції ендокринної системи самців (Guideline 890.1500, US EPA) та гепатоканцерогенезу (модель “НДЕА-гепатектомія”, IARC) можуть бути рекомендовані для застосування в батареї альтернативних тестів з ідентифікації канцерогенності генеричних пестицидів з гормональним і промоторним механізмами дії.

Ключові слова: карбендазим, щури Wistar, миші СВА, ювенільні щури-самці Wistar, канцерогенність, хронічний експеримент, гепатоканцерогенез, промоторна активність, гематотоксичність, ендокринні порушення.

АННОТАЦИЯ

Лисовская В.С. Идентификация потенциальной канцерогенности карбендазима. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.06 “токсикология”. – ГП “Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И. Медведя МЗ Украины”, Киев, 2020.

Диссертационная работа посвящена изучению потенциальной канцерогенности фунгицида карбендазима и возможных механизмов реализации эффекта. Наряду с классическими хроническими экспериментами по изучению канцерогенной активности на крысах и мышах обоего пола исследовали промоторный эффект карбендазима, влияние на систему крови, органы эндокринной и половой систем ювенильных крыс-самцов и т.д.

Установлено повышение общей частоты опухолей у крыс-самок за счет опухолей щитовидной и молочной желез, гипофиза в условиях хронического эксперимента. У самцов обнаружены неопухоловые деструктивно-дистрофические, предраковые гиперпластические изменения и увеличение частоты опухолей семенников. Влияние карбендазима на эндокринную систему взрослых крыс Wistar в условиях хронического эксперимента подтверждено повреждающим действием на морфофункциональные показатели эндокринных и половых органов ювенильных крыс. Не выявлено канцерогенных свойств карбендазима у мышей линии СВА. Установлены цитотоксическое действие и анемизирующий эффект карбендазима в периферической крови крыс на уровне высоких доз. Выявлена способность карбендазима увеличивать количество пренеопластических гамма-глутамилтрансфераза-положительных узелков в печени крыс.

Таким образом, карбендазим в экспериментах *in vivo* на крысах Wistar проявляет слабый онкогенный эффект с возможностью реализации опосредованно как через эндокринную систему, так и через механизм промоции. Используемые в исследовании методики по определению нарушений функции эндокринной системы самцов (Guideline 890.1500, US EPA) и гепатоканцерогенеза (модель “НДЕА-гепатэктомии”, IARC) могут быть рекомендованы для применения в батарее альтернативных тестов для идентификации канцерогенности генерических пестицидов с гормональным и промоторным механизмами действия.

Ключевые слова: карбендазим, крысы Wistar, мыши СВА, ювенильные крысы-самцы Wistar, канцерогенность, хронический эксперимент, гепатоканцерогенез, промоторная активность, гематотоксичность, эндокринные нарушения.

SUMMARY

Lisovska V.S. Identification of potential carcinogenicity of carbendazim. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for a scientific degree of candidate of biological sciences in specialty 14.03.06 “Toxicology”. – L.I. Medved Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety Ministry of Health Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of potential carcinogenicity of fungicide carbendazim and to determine the possible mechanism of action of carcinogenic activity.

Complex, the long-term classic studies of the carcinogenic effect of carbendazim in CBA mice and Wistar rats with the analysis the main direct indicators as the tumor rate, latent period, survival the animals with tumors, dose-effect have been carried out. Additional tests for assessment the potential key elements involved in the mechanism of realization the carcinogenic activity carbendazim were used: histopathological, cyto- and

histochemical, hematological and study of promoter properties in the NDEA-partial hepatectomy model, study of the effect on the endocrine system in Pubertal Development/Juvenile Male Rats model.

Carcinogenicity carbendazim evaluated using of Wistar rats and CBA mice both sexes, which were given test-substance at doses of 0, 5, 25 and 75 mg/kg body weight for 104 weeks and 78 weeks. As a result, increase incidents "all tumors" in females (45 and 40 versus 23 in control) at doses of 5 and 25 mg/kg bw was obtained and Leydig cell tumors in male (9 versus 3 in control) rats treated with carbendazim at doses of 25 mg/kg bw was obtained. The increase in the tumour frequency in females was based on an increased incidence of thyroid tumors, mammary gland and pituitary tumors. A treatment-related increase in the incidence of non-neoplastic degenerative, preneoplastic hyperplastic lesions of testis was found in males Wistar rats. A statistically significant increase incidents of spermatogenic epytelium atrofia and Leydig cell proliferation was observed in the 25 and 75 mg/kg bw male dosage group. The effect of carbendazim to the endocrine system of adult rats in a chronic experiment was suggested by adverse morphofunctional changes to the endocrine and reproductive organs of juvenile rats. A statistically significant decrease the body weight and body weight gaine, increase the pituitary weight, adrenal and epididymis weight and decrease testis weight were observed in 75 mg/kg bw male dosage group. In this dosage group increase incidents of spermatogenic epytelium atrofia and epididymis degenerative lesions was observed.

No carcinogenicity of carbendazim were detected in CBA mice at doses of 0, 5, 25 and 75 mg/kg bw over a 78-weeks period.

Cytotoxic effect and anemic effect on rat's peripheral blood on the level of high doses (750 mg/kg bw) was confirmed. The ability of carbendazim to increase the number (no arias) of hyperplastic GGT-positive foci in the rat liver in dose of 75 mg/kg bw have been established in hepatocarcinogenesis test.

Thus, a weak oncogenic effect of carbendazim in *in vivo* experiments in Wistar rats with possibility of implementation both through the endocrine system and through the mechanism of promotion have been detected. Despite the weak oncogenic potential, the mode of action through the endocrine system may be relevant for humans. Carcinogenic NOAEL on the level 5 mg/kg bw was proposed. Acceptable daily intake in Ukraine guarantees safety for this effect. Experimental methods which used in the study such as effect to the male endocrine system (Guideline 890.1500, US EPA) and hepatocarcinogenic ("NDEA-hepatectomy", IARC) model may be recommend for use in set of alternative tests to identify carcinogenicity of generic pesticides with similar mechanism of action

Key words: carbendazim, Wistar rats, CBA mice, juvenile male Wistar rats, carcinogenicity, chronic experiment, hepatocarcinogenesis, promoter activity, hematotoxicity, endocrine disruptors.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

BOO3/WHO	Всесвітня організація охорони здоров'я
ГГТ	гамма-глутамілтрансфераза
МАВР/IARC	Міжнародна агенція з вивчення раку
НДЕА	нітрозодиетиламін
СТЖ	середня тривалість життя
ФАО/FAO	Агенція з харчових і сільськогосподарських продуктів при Організації Об'єднаних Націй
EFSA	Європейське агентство з безпеки продуктів
NOAEL	доза, при якій не спостерігається несприятливого ефекту (no-observed-adverse-effect level)
OECD	Організація економічного співробітництва та розвитку
PPDB	База даних щодо властивостей пестицидів
US EPA	Агенція з охорони навколишнього середовища США