

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДП “НАУКОВИЙ ЦЕНТР ПРЕВЕНТИВНОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ, ХАРЧОВОЇ І
ХІМІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ІМЕНІ АКАДЕМІКА Л.І. МЕДВЕДЯ МІНІСТЕРСТВА
ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ”

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЛІСОВСЬКА ВІКТОРІЯ СЕМЕНІВНА

УДК: 616-006:632.95.024.001.3

ДИСЕРТАЦІЯ
ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ КАНЦЕРОГЕННОСТІ
КАРБЕНДАЗИМУ

14.03.06 – Токсикологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В.С. Лісовська

Науковий керівник Баглій Євген Ананійович, доктор медичних наук

Київ – 2020

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.

Пестициди стали невід’ємною складовою сучасного сільського господарства. Тривале та глобальне їх розповсюдження, персистентність в об’єктах довкілля, комплексна, поєднана та сумісна дія з іншими ксенобіотиками призводять до постійного безпосереднього чи опосередкованого впливу на все населення впродовж кількох поколінь. За період “глобальної хімізації” онкозахворюваність у всьому світі стала надзвичайно серйозною медико-біологічною та соціально-економічною проблемою. Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров’я (WHO), у світі впродовж 2018 року зафіксовані 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 хімічні речовини (пестициди).

Дисертаційна робота присвячена вивченню потенційної канцерогенності пестицидного препарату карбендазиму та з’ясуванню можливих механізмів реалізації його онкогенної дії. Проведене *in vivo* дослідження канцерогенних властивостей карбендазиму з урахуванням впливу на систему крові, органи ендокринної та статеві системи. У роботі поряд з класичними хронічними експериментами з вивчення канцерогенної активності ксенобіотиків на двох видах лабораторних тварин (щурах і мишах) обох статей (OECD 451 і IARC) виконані додаткові дослідження впливу карбендазиму на гематологічні, морфологічні та цитохімічні

показники периферичної крові, вивчені фізіологічні особливості розвитку тварин у пубертатний період, гістоморфологічні та морфофункціональні зміни в органах ендокринної та статеві систем ювенільних щурів, промоторний ефект карбендазиму.

За результатами дослідження в умовах 104-тижневого хронічного експерименту на щурах Wistar під час впливу карбендазиму в дозах 0, 5, 25, 75 мг/кг загибелі тварин, пов'язаної з дією речовини, не встановлено. Не виявлено відмінностей гістоморфологічного спектра пухлин у тварин, які отримували карбендазим. Не встановлено новоутворень, що не характерні для щурів Wistar. За результатами кількісної оцінки спектра новоутворень виявлене збільшення частоти гормонозалежних пухлин. У щурів-самиць спостерігалось достовірне зростання частоти пухлин щитоподібної (доза 5 мг/кг; $p < 0,05$) і молочної (دوزи 5 і 25 мг/кг; $p < 0,05$) залоз, гіпофізу (доза 75 мг/кг; $p < 0,05$); у самців встановлене збільшення частоти лейдигоклітинних пухлин (доза 25 мг/кг; $p < 0,05$). Статистично достовірної різниці між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин, не встановлено. Метастазуюча пухлина діагностована в 1 випадку: в самиці за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг. Коефіцієнт множинності пухлин статистично не відрізнявся між піддослідними та контрольною групами. Кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних. Середня тривалість життя (СТЖ) всіх тварин і тварин з пухлинами, які отримували карбендазим, не відрізнялася від контрольних. Показано, що час виявлення першої пухлини та термін середнього латентного періоду розвитку пухлини співставні в піддослідних і контрольній групах. Встановлена відсутність залежності загальної частоти пухлин у піддослідних тварин від дози карбендазиму. Переважна більшість пухлин виявлена як у самців ($p \geq 0,05$), так і самиць ($p \leq 0,05$) за дії карбендазиму в дозах 5 і 25 мг/кг. За підсумками аналізу непухлинної патології з'ясовано, що вплив карбендазиму в дозах 25 і 75 мг/кг спричиняє деструктивні зміни в сім'яниках: атрофію та лейдигоклітинну гіперплазію ($p \leq 0,05$). Виявлені неспецифічні гемодинамічні

та деструктивно-дистрофічні зміни в паренхіматозних органах вікового та компенсаторно-адаптаційного характерів не виходять за межі фізіологічних коливань контрольних тварин і не пов'язані з уведенням речовини.

В умовах хронічного перорального надходження карбендазиму до організму самців і самиць мишей СВА впродовж 78 тижнів у дозах 0, 5, 25, 75 мг/кг загибелі тварин, пов'язаної з дією речовини, не встановлено. Не виявлено відмінностей гістоморфологічного спектра пухлин у тварин, які отримували карбендазим. Не встановлено новоутворень, що не характерні для мишей СВА. Статистично достовірної різниці між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин, не встановлено. У самців кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних. У самиць злоякісних пухлин виявлено більше, ніж доброякісних. Метастатичні та множинні пухлини в даному експерименті не спостерігалися. СТЖ всіх тварин і тварин з пухлинами, які отримували карбендазим, не відрізнялася від контрольних. Показано, що час виявлення першої пухлини та термін середнього латентного періоду розвитку пухлини співставні в піддослідних і контрольній групах. Встановлена відсутність залежності загальної частоти пухлин у піддослідних тварин від дози карбендазиму. Під час аналізу непухлинної патології виявлено, що встановлені неспецифічні гемодинамічні та деструктивно-дистрофічні зміни в паренхіматозних органах вікового та компенсаторно-адаптаційного характерів не виходять за межі фізіологічних коливань контрольних тварин і не пов'язані з уведенням карбендазиму. Діагностовані передпухлинні стани (гіперплазії) носили випадковий характер і не були зв'язані з впливом речовини.

За умов гострої пероральної інтоксикації тварин карбендазимом у дозі 750 мг/кг у різні терміни експерименту в периферичній крові виявлене зменшення кількості формених елементів крові. Основним механізмом гематотоксичного впливу речовини були цитотоксична дія й анемізуючий ефект. Вплив карбендазиму спричиняв руйнування лейкоцитів у судинному

руслі, а також призводив до появи морфологічно змінених клітин лейкоцитарного ($p \leq 0,05$) та еритроцитарного рядів. За дії речовини було встановлене зменшення кількості лейкоцитів (з подальшою компенсаторною реакцією системи крові), тромбоцитів, еритроцитів (з попереднім зниженням чисельності ретикулоцитів) і зменшення рівня гемоглобіну ($p \leq 0,05$). Встановлене зниження ферментативної активності лейкоцитів ($p \leq 0,05$) корелювало з виходом молодих клітин у периферичну кров.

В умовах хронічної 104-тижневої експозиції карбендазимом у дозах 0, 5, 25, 75 мг/кг у щурів чіткої залежності “доза-час-ефект” як з боку клітин червоної, так і білої крові не спостерігалось. Виявлені морфологічні та морфофункціональні зміни в еритроцитах (анізоцитоз, акантоцитоз і поліхромазія) є свідченням слабого анемізуючого ефекту, що має прихований характер. Токсикологічних значущих змін кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів не зазначено, проте в окремі терміни досліджень у щурів відзначалося зниження кількості базофілів, еозинофілів, паличкоядерних нейтрофілів, прослідковувалася тенденція до моноцитозу, в кров’яному руслі виявлялися поодинокі макрофаги, а також спостерігалися морфологічні зміни низки клітин білої крові (лімфоцити, нейтрофіли, моноцити). В окремих щурів-самців з онкопатологіями виявлялася підвищена кількість моноцитів і макрофагів.

За результатами дослідження впливу карбендазиму в дозах 0, 10 і 75 мг/кг на організм щурів передпубертатного віку встановлено, що в групі тварин, які отримували речовину в дозі 10 мг/кг, за фізіологічними та морфофункціональними показниками (затримка відділення препуцію, дозозалежні зміни росту, зміни маси статевих органів і органів ендокринної системи) не виявлено ознак порушень балансу статевих гормонів. За дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг встановлені зниження маси тіла, приросту маси тіла та маси тіла на момент статевого дозрівання (відділення препуцію), зниження абсолютної маси сім’яників, збільшення абсолютної маси епідидимісів, абсолютної та відносної маси гіпофізу і надниркових залоз

($p \leq 0,05$). Під час гістоморфологічного дослідження епідидимісів і сім'яників тварин виявлені морфофункціональні та деструктивно-атрофічні зміни. В епідидимісах встановлені наявність клітинного детриту та зменшення кількості сперматогенної субстанції ($p \leq 0,05$), у сім'яниках – десквамація клітин сперматогенного епітелію, зниження рядності й атрофія сперматогенного епітелію звивистих каналців ($p \leq 0,05$). Виявлена статистично достовірна кореляція між змінами абсолютної маси гіпофізу, сім'яників та відносної маси гіпофізу, надниркових залоз ($p \leq 0,05$). Порушення функції сім'яників пов'язане зі збільшенням маси гіпофізу та надниркових залоз. Зменшення маси тіла тварин на момент статевого дозрівання, а також морфофункціональні зміни в осі “гіпофіз – кора надниркових залоз – гонади” свідчать про дисгормональні зміни в організмі.

В умовах середньострокового експерименту під час дослідження промоторної активності карбендазиму в дозах 0, 25, 75, 300 мг/кг встановлено, що речовина не виявляє властивостей, характерних для дії класичних промоторів, залежності ефекту від дози речовини не спостерігалось. Достовірне збільшення кількості гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ)-позитивних вузликів у печінці тварин як свідчення слабого промоторного ефекту відмічене за дії середньої з вивчених доз речовини (75 мг/кг маси тіла).

Отже, карбендазим в експериментах *in vivo* на лабораторних тваринах проявив слабкий онкогенний ефект з дискусійною релевантністю механізмів розвитку пухлин для людини та продемонстрував ендокриндизрапторні властивості, релевантність яких не виключена для людини. Доза, при якій не спостерігається несприятливого ефекту (NOAEL) щодо канцерогенності карбендазиму рекомендована на рівні 5 мг/кг. Добова допустима доза для людини в Україні затверджена на рівні 0,01 мг/кг і, таким чином, ураховує всі виявлені ефекти карбендазиму.

Результати дисертаційної роботи з вивчення канцерогенності карбендазиму в хронічних експериментах можуть бути використані під час

ідентифікації канцерогенної небезпеки інших генериків цієї речовини. Відпрацьовані під час дослідження методики з визначення порушень функції ендокринної системи в щурів-самців і промоторної активності гепатоканцерогенів запропоновані для використання в батареї альтернативних тестів з ідентифікації канцерогенності пестицидів-генериків 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.

SUMMARY

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

Dissertation for a degree of Candidate of Biological Sciences in specialty 14.03.06 “Toxicology”. – SE “L.I. Medved Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety of the MH of Ukraine”, Kyiv, 2020.

Pesticides have become an integral part of modern agriculture. Their long-term and global distribution, persistence in environmental objects, complex, combined and joint action with other xenobiotics lead to a constant direct or indirect impact on the entire population for several generations. Cancer worldwide has become an extremely serious medical, biological and socio-economic problem during the period of “global chemicalization”. According to the WHO, 18.1 million new cases of cancer were registered in the world in 2018. In Ukraine, this number reaches 169 817 (WHO, 2019). According to experts from the International Agency for Research on Cancer (IARC), the main cause of cancer is environmental factors, in particular chemicals, including pesticides.

The dissertation is devoted to the study of the potential carcinogenicity of the pesticide carbendazim and to the elucidation of possible mechanisms of its

oncogenic action. Comprehensive *in vivo* studies of the carcinogenic properties of carbendazim were performed, considering the effects on the blood system, endocrine and reproductive system.

In this paper, along with classical chronic experiments for studying the carcinogenic activity of xenobiotics in two species of laboratory animals (rats and mice) of both sexes (OECD 451 and IARC), were performed additional studies of the effect of carbendazim on hematological, morphological and cytochemical parameters of peripheral blood features of animal development during puberty, histomorphological and morphofunctional changes in the organs of the endocrine and reproductive system of juvenile rats and the promoter effect of carbendazim.

As a result of the study in a 104-weeks chronic experiment in Wistar rats exposed to carbendazim at doses of 0, 5, 25, 75 mg/kg, the death of animals due to the action of the substance was not found. No differences in the histomorphological spectrum of tumors in animals treated with carbendazim were found. No neoplasms that are not characteristic of Wistar rats were detected. According to the results of quantitative assessment of the spectrum of tumors, an increase in the frequency of hormone-dependent tumors was found. In female rats, a significant increase in the incidence of thyroid tumors (dose 5 mg/kg; $p < 0,05$), breast (dose 5 mg/kg and 25 mg/kg; $p < 0,05$), pituitary tumors (75 mg/kg; $p < 0,05$); in males there was an increase in the frequency of Leydig cellular tumors (dose 25 mg/kg; $p < 0,05$). There was no statistically significant difference between the incidence of malignancies diagnosed in experimental and control animals. Metastatic tumor was diagnosed in one case: in a female under the action of carbendazim at a dose of 25 mg/kg. The tumor multiplicity ratio did not differ statistically between the experimental and control groups. The number of benign tumors exceeded the number of malignant. The average life expectancy of all animals and animals with tumors that received carbendazim did not differ from the control group. It is shown that the time of detection of the first tumor and the term of the average latent period of tumor development are comparable in the experimental and control groups. There was no dependence of the total frequency

of tumors in experimental animals on the dose of carbendazim. The predominant number of tumors was detected in both males ($p \geq 0,05$) and females ($p \leq 0,05$) under the action of carbendazim at doses of 5 and 25 mg/kg. The analysis of non-neoplastic pathology revealed that the effect of carbendazim in doses of 25 and 75 mg/kg causes destructive changes in the testes: atrophy and Leydig cellular hyperplasia ($p \leq 0,05$). The detected nonspecific hemodynamic and destructive-dystrophic changes in parenchymal organs of age and compensatory-adaptive nature do not go beyond the physiological fluctuations of control animals and are not associated with the injection of carbendazim.

In the case of chronic oral admission of carbendazim to male and female CBA mice, for 78 weeks, at doses of 0, 5, 25, 75 mg/kg, the death of animals associated with the action of the substance was not established. No differences in the histomorphological spectrum of tumors in animals treated with carbendazim were found. No neoplasms that are not characteristic of CBA mice were detected. No statistically significant difference between the incidence of malignancies diagnosed in experimental and control animals was found. In males, the number of benign tumors exceeded the number of malignant. In females – more malignant tumors than benign.

Metastatic and multiple tumors were not observed in this experiment. The average life expectancy of animals and animals with tumors receiving carbendazim did not differ from the control group. It is shown that the time of detection of the first tumor and the term of the average latent period of tumor development are comparable in the experimental and control groups. There was no dependence of the total frequency of tumors in experimental animals on the dose of carbendazim. During the analysis of non-neoplastic pathology, it was found that the detected nonspecific hemodynamic and destructive-dystrophic changes in parenchymal organs of age and compensatory-adaptive nature do not go beyond the physiological fluctuations of control animals and are not associated with the introduction of carbendazim. Diagnosed precancerous conditions (hyperplasia) were random and were not associated with exposure to carbendazim.

Under conditions of acute oral intoxication of animals with carbendazim at a dose of 750 mg/kg at different times of the experiment in the peripheral blood revealed a decrease in the number of formed blood cells. The main mechanism of hematotoxic effect of carbendazim was cytotoxic action and anemic effect. Exposure to carbendazim caused the destruction of leukocytes in the vascular bed, and also led to the appearance of morphologically altered cells of the leukocyte ($p \leq 0,05$) and erythrocyte series. Carbendazim showed a decrease in the number of leukocytes (followed by a compensatory reaction of the blood system), platelets, erythrocytes (with a previous decrease in reticulocytes) and a decrease in hemoglobin ($p \leq 0,05$). The established decrease in the enzymatic activity of leukocytes ($p \leq 0,05$) correlated with the release of young cells into the peripheral blood.

Under conditions of chronic 104-week exposure to carbendazim at doses of 0, 5, 25, 75 mg/kg in rats, a clear dose-time-effect relationship between both red and white blood cells was not observed. Identified morphological and morpho-functional changes in erythrocytes: anisocytosis, acanthocytosis and polychromasia, are evidence of a weak anemic effect which has a latent nature. Toxicologically significant changes in the number of leukocytes, lymphocytes, monocytes were not noted, but in some periods of research in rats there was a decrease in the number of basophils, eosinophils, rod-shaped neutrophils, there was a tendency to monocytosis. Single macrophages were detected in the bloodstream, and morphological changes of a number of white blood cells (lymphocytes, neutrophils, monocytes) were observed. An increased number of monocytes and macrophages was found in some male rats with oncological pathologies.

According to the results of the study of the effect of carbendazim at doses of 0, 10 and 75 mg/kg on the body of prepubertal rats, it was found that in the group of animals receiving carbendazim at a dose of 10 mg/kg on physiological and morpho-functional parameters (delay of foreskin, dose-dependent changes growth, changes in the mass of the genitals and organs of the endocrine system) there are

no signs of imbalance of sex hormones. Under the action of carbendazim at a dose of 75 mg/kg revealed a decrease in body weight, weight gain at puberty (foreskin separation), decrease in absolute testicular weight, increase in absolute mass of epididymis, increase in absolute and relative mass of pituitary and adrenal glands ($p \leq 0,05$). Morpho-functional and destructive-atrophic changes were found during histomorphological examination of epididymis and testes of animals. The presence of cellular detritus and a decrease in the amount of spermatogenic substance ($p \leq 0,05$) were detected in the epididymis. In the testes – desquamation of spermatogenic epithelial cells, decreased order and atrophy of the spermatogenic epithelium of the convoluted tubules ($p \leq 0,05$). A statistically significant correlation was found between changes in the absolute mass of the pituitary and testes and the relative mass of the pituitary and adrenal glands ($p \leq 0,05$). Testicular dysfunction is associated with an increase in the mass of the pituitary and adrenal glands. Decrease in body weight of animals at the time of puberty, as well as morpho-functional changes in the axis “pituitary – adrenal cortex – gonads” indicate dyshormonal changes in the body.

In the medium-term experiment in the study of the promoter activity of carbendazim at doses of 0, 25, 75, 300 mg/kg found that the substance does not exhibit properties characteristic of the action of classical promoters, the dependence of the effect on the dose of the drug was not detected. Significant increase in the number of GGT-positive nodules in the liver of animals, as evidence of a weak promoter effect, observed under the action of the average of the studied dose of the substance, 75 mg/kg body weight.

Thus, carbendazim in *in vivo* experiments on laboratory animals showed a weak oncogenic effect with debatable relevance of the mechanisms of tumor development for humans and demonstrated endocrine-damaging properties, the mechanism of which is inherent in humans. NOAEL is recommended for carcinogenicity rats at 5 mg/kg. The daily allowable dose in Ukraine is approved at the level of 0,01 mg/kg and, thus, considers all the effects of carbendazim identified in the study.

The results of the dissertation work on the study of the carcinogenicity of carbendazim in chronic experiments can be used in the identification of carcinogenic hazards of other generics of this substance. The methods developed during the study to determine endocrine dysfunction in male rats and the promoter activity of hepatocarcinogens are proposed for use in a battery of alternative tests to identify the carcinogenicity of generic pesticides with hormonal and promoter mechanisms of action.

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

Список публікацій здобувача

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 проведени аналіз літератури, гістоморфологічні і гістохімічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).*

2. Баглей Е.А., Недопитанская Н.Н., Решавская Е.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.Н.. 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 проведени фізіологічні, патоморфологічні, гістоморфологічні дослідження, аналіз та обробка отриманих даних, написання й оформлення статті).*

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.,** Жмілько 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. Том 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. Том 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. N7. Том LXXI. С. 1274-81 <http://wl.medlist.org/2018/12/02/07-2018-13>. (Експериментально-методична стаття - дисертанткою проведені гістоморфологічні і гістохімічні дослідження).

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

11. **Лісовська В.С.** Патоморфологічна характеристика пухлин щитовидної залози білих нелінійних щурів. Тези доповідей науково-практичної конференції "Організація токсикологічної допомоги в Україні" (20-21 травня 2002). Київ. 2002. С. 23–26.

12. **Lisovska V.**, Shulyak V., Nedoputanska N. Carbendazim administration to the blood system of rats. Abstracts of the 42nd CONGRESS of EUROPEAN SOCIETIES of TOXICOLOGY. Cracov, Poland 11th -14th of September. 2005. S 141.

13. Баглий Є.А., Недопитанська Н.М., Лісовська В.С., Решавська О.В. Використання моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА - часткова гепатектомія» для визначення канцерогенної небезпеки пестицидів: мат. 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. Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.466>.

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 – Science providing solutions. Helsinki, Finland 8th –11th of September. 2019. P.4–5.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ, ТОКСИЧНІ ТА КАНЦЕРОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	27
1.1. Загальна характеристика та поведінка речовин бензімідазольного ряду в об'єктах навколишнього середовища	27
1.2. Токсикологічна характеристика, метаболізм, механізм біологічної і фунгіцидної дії карбендазиму	29
1.3. Особливості токсичної дії карбендазиму на організм ссавців	32
1.4. Генотоксичні, цитотоксичні та канцерогенні ефекти карбендазиму	42
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
2.1. Матеріали та біологічні моделі	53
2.2. Умови експериментів і методи дослідження	56
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ КАНЦЕРОГЕННОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ НА ДВОХ ВИДАХ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН (ЩУРИ ПОРОДИ WISTAR І МИШІ ЛІНІЇ СВА)	63
3.1. Дослідження потенційної канцерогенності карбендазиму на щурах Wistar (самці та самиці)	63
3.2. Дослідження потенційної канцерогенності карбендазиму на мишах СВА (самці та самиці)	84
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КАРБЕНДАЗИМУ НА СИСТЕМУ КРОВІ ЩУРІВ WISTAR	94
4.1. Дослідження впливу карбендазиму на показники периферичної крові щурів-самців Wistar за умов гострої пероральної інтоксикації	94

4.2. Дослідження впливу карбендазиму на показники периферичної крові щурів Wistar (самців і самиць) за умов хронічної пероральної інтоксикації	100
РОЗДІЛ 5. МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ОНКОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ КАРБЕНДАЗИМУ	105
5.1. Дослідження ендокриндизрапторних властивостей карбендазиму на ювенільних/передпубертатних щурах-самцях Wistar	105
5.2. Дослідження промоторної дії карбендазиму за умов середньострокової пероральної інтоксикації на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”	116
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	122
ВИСНОВКИ	145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	147
Додаток А	171
Додаток Б	181
Додаток В	190
Додаток Г	193
Додаток Д	194

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ

BOOZ/WHO	Всесвітня організація охорони здоров'я
ГГТ	гамма-глутамілтрансфераза
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЛГ	лютеїнізуючий гормон
МАВР/IARC	Міжнародна агенція з вивчення раку
НДЕА	нітрозодietiламін
СГЕ	середній вміст гемоглобіну в еритроциті
СТЖ	середня тривалість життя
СЦК	середній цитохімічний коефіцієнт
ФАО/FAO	Агенція з харчових і сільськогосподарських продуктів при Організації Об'єднаних Націй
ФСГ	фолікулостимулюючий гормон
CV	коефіцієнт варіації
EFSA	Європейське агентство з безпеки продуктів
EPA	Агенція з охорони навколишнього середовища
IL-1 β	інтерлейкін 1 β
LABC	комплекс м'язів (levator ani/bulbocavernosus)
LD50	середньолетальна доза піддослідних тварин
NF- κ B	ядерний фактор транскрипції κ B
NOEL	доза, за якої відсутні прояви токсичного впливу речовини
NOAEL	доза, за якої не спостерігається несприятливого ефекту
OECD	Організація економічного співробітництва та розвитку
PND	постнатальний період, період після народження
TNF- α	фактор некрозу пухлин α
US EPA	Агенція з охорони навколишнього середовища США

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Онкозахворюваність у всьому світі стала надзвичайно серйозною медико-біологічною та соціально-економічною проблемою. 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 [1]. На думку експертів Міжнародної агенції з вивчення раку (IARC), основною причиною розвитку раку є фактори навколишнього середовища, зокрема хімічні речовини (пестициди).

Перегляду токсикологічних характеристик окремих агрохімікатів (пестицидів), що довгий час вважалися безпечними та дозволеними до широкого застосування [5, 6], сприяло накопичення нових даних щодо прихованих або токсичних ефектів, не виявлених під час первинних досліджень, давно відомих речовин, їх кумулятивного токсичного впливу на окремі системи організму людини та тварин. Саме до таких речовин належать бензімідазоли, представником яких є карбендазим (метил-Н-бензімідазол-2-іл-карбамат), що багато років широко використовується як фунгіцид системної дії для захисту рослин, обробки продукції в передпродажний період, біоцид у лакофарбовій, шкіряній, будівельній і паперовій промисловості, лікарський засіб тощо [7, 10, 42, 51].

Стійкість цієї речовини в довкіллі та великі обсяги застосування, що вимірюються десятками тисяч тон, посилюють вірогідність надходження його до організму людини не лише безпосередньо, але й у вигляді залишкових кількостей у вирощеній продукції та забрудненій воді [18, 24, 25].

Механізм фунгіцидної дії карбендазиму полягає у взаємодії з β -тубуліном і пригніченні полімеризації мікротрубочок, що призводить до порушення сегрегації хромосом під час поділу клітин, а надалі через припинення поділу до їхньої загибелі [45, 46]. Подібний ефект

спостерігається й у клітинах ссавців [50, 77].

Попри низьку середньолетальну дозу (LD50) для лабораторних тварин (>2000-10000 мг/кг), карбендазим володіє експериментально доведеною репродуктивною токсичністю для самців і самиць [81, 86, 87, 89, 92], генотоксичністю [130, 135], впливає на гематологічні та біохімічні показники [41, 51], спричиняє гепатотоксичність [39, 59] та є канцерогеном в окремих ліній мишей [13, 14, 74]. За впливу карбендазиму з нітритом натрію в період вагітності мишей лінії Swiss у новонароджених тварин були виявлені лімфоми [140].

Як канцероген групи C (можливий канцероген для людини) карбендазим був класифікований експертами Агенції з охорони навколишнього середовища США (US EPA) ще в 1986 році. Даний висновок базується на результатах кількох хронічних досліджень, згідно з якими в мишей двох ліній (CD-1 і Swiss) було виявлене збільшення частоти пухлин печінки [13]. У щурів канцерогенність не встановлена [13, 33].

Результати досліджень канцерогенності карбендазиму *in vivo*, що були виконані понад 40 років тому, представлені в анотованому вигляді. Існуючі дані застарілі, неоднозначні, не всі опубліковані, в офіційних документах посилання робляться на неопубліковані джерела щодо канцерогенності даної речовини. Проте питання, чому генотоксикант не спричиняє онкогенного ефекту, залишається відкритим. Про це свідчать різні погляди експертів Агенції з навколишнього середовища США, які відносять карбендазим до генотоксичних канцерогенів, і експертів Європейського Союзу, які не класифікують його як канцероген, а виявлене збільшення частоти пухлин у мишей вважають видоспецифічним і нерелевантним для людини [15].

Нові дані досліджень щодо молекулярних механізмів дії карбендазиму свідчать про можливість його впливу на процеси метилювання/деметилювання дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) [123], пригнічення синтезу прозапальних цитокінів (інтерлейкін 1 β (IL-1 β), фактора некрозу пухлин α (TNF- α)), активних форм азоту [114], активацію ядерного

фактора транскрипції κВ (NF-κВ) [143], генотоксичність [135], оксидативний стрес [43, 70]. Виявлені ефекти тим чи іншим чином можуть стати причиною онкогенезу. Результати аналізу канцерогенного потенціалу карбендазиму за електронними параметрами, що відображають взаємодію з ДНК, також доводять його наявність [139].

Особливої уваги заслуговують дані щодо дуалізму властивості карбендазиму впливати на веретено поділу клітини: з одного боку, це обумовлює його фунгіцидну дію, з іншого, – інгібує проліферацію пухлинних клітин ссавців, зокрема в культурі ракових клітин людини [50], тобто активно втручається в мітоз клітин як грибів, так і людини. Цитотоксичність та інгібування високопроліферуючих тканин [94] викликає зацікавленість до даного фунгіциду як протипухлинного цитостатика [34].

За рішенням Європейської комісії (2007) карбендазим був включений до пріоритетного списку ендокрин-пошкоджуючих сполук як потенційна ендокрин-активна речовина з присвоєнням відповідної категорії ризику [15]. Окремими дослідженнями було доведено, що карбендазим може впливати як на гормональну чутливість клітин гонад, так і безпосередньо на синтез гормонів [68, 71], тимчасом як відомо, що зміни гормонального фону, які взаємопов'язані з інтенсивністю проліферації та регулюванням активності клітинного імунітету, можуть призвести до розвитку неоплазій.

Попри припинення застосування даної речовини в багатьох країнах світу в якості пестициду [16], карбендазим використовується як біоцид і продовжує надходити в довкілля. Пестицидні препарати на його основі широко застосовуються в країнах Близького та Далекого Сходу, Латинській Америці, Великій Британії, деяких країнах Європейського Союзу [17-20], зокрема в Україні.

Враховуючи вищезазначене, дослідження потенційної канцерогенності карбендазиму, а також з'ясування можливих механізмів реалізації його онкогенного потенціалу є актуальним науково-практичним завданням сучасної токсикології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках плану 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 “НДА-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 одержаних результатів.

Уперше на підставі експериментальних досліджень генеричного карбендазиму в умовах хронічного, коротко- і середньострокових експериментів отримано нові дані щодо канцерогенності досліджуваної речовини. Вперше встановлено нелінійне збільшення частоти гормональнозалежних пухлин у щурів Wistar: лейдигом у самців; пухлин гіпофізу, щитоподібної і молочної залози 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 виявлено відсутність канцерогенного ефекту. Встановлена здатність карбендазиму проявляти цитотоксичну і анемізуючу дію при надходженні у високих дозах, спричиняти кількісні і морфологічні зміни клітин білої крові, що може свідчити про порушення імунного статусу організму щурів. Уперше встановлена 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 у сім'яниках і епідидимісах, збільшується маса гіпофізу і наднирникових залоз. Вперше показано ендокриндизрапторну дію карбендазиму на ювенільних щурах самцях Wistar, обумовлену морфофункціональними і гістоморфологічними порушеннями у

гіпофізі, наднирниках, 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 небезпечності для людини, а також при обґрунтуванні гігієнічних нормативів і регламентів безпечного використання препаративних форм 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 нові підходи щодо 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 запропонованих методик полягає у високій інформативності, суттєвому прискоренні термінів отримання результатів (у 5-6 разів швидше) та 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 проведення досліджень. Авторкою самостійно проведені та викладені результати власних експериментальних досліджень. Самостійно виконана статистична обробка отриманих даних, проаналізовані й узагальнені результати роботи, сформульовані основні висновки, підготовлені до друку наукові публікації за темою дисертації. Під час вивчення 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 карбендазиму проведені спільно з кандидатом біологічних наук В.Г. Шуляк і з консультативною допомогою доктора біологічних наук П.Г. Жмінько. 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.); I 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.).

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.

РОЗДІЛ 1

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ, ТОКСИЧНІ ТА КАНЦЕРОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Загальна характеристика та поведінка речовин бензімідазольного ряду в об'єктах навколишнього середовища

На сьогодні найбільш ефективними, широкоживаними та доступними засобами захисту рослин від захворювань, викликаних патогенними грибами, є хімічні препарати – фунгіциди. Щорічно для попередження втрат врожаю від грибкових захворювань, що можуть досягати 30-50 % [2], і забезпечення так званих потреб 4F – їжа, корм, паливо, волокна (food, feed, fuel and fibers), що на сьогодні є основою економіки, у світі використовують близько 300 тис. тон фунгіцидів [3, 4].

За останні роки, з появою більш жорстких законодавчих вимог до екологічної безпеки використання пестицидів, розпочався процес поступового перегляду препаратів, що довгий час вважалися безпечними та дозволеними для широкого застосування [5, 6]. Пестицидами, що привернули увагу екологів і токсикологів, стали фунгіциди групи бензімідазолів.

Бензімідазоли – це група азотвмісних гетероциклічних сполук із широким спектром біологічної активності. Проте найбільш широке застосування бензімідазоли отримали в двох галузях – як нематоциди та фунгіциди [7-11]. Застосування бензімідазолів у сільському господарстві для боротьби з фітопатогенними грибами розпочалося в 1960-х рр. [5].

У великих об'ємах на сьогодні застосовується група МБК (метил бензімідазол карбамат) - бензімідазолів, найбільш важливим для дослідження представником якої є карбендазим, оскільки він одночасно є метаболітом двох інших розповсюджених бензімідазольних фунгіцидів – беномілу та тіофанат-метилу. Річний оборот карбендазиму на світовому ринку як активного інгредієнту фунгіцидів складає понад 12000 тон [4].

Повідомлення щодо можливих токсичних ефектів бензімідазольних фунгіцидів групи МБК, зокрема карбендазиму, почали з'являтися вже в дослідженнях 1982-1988 рр. Були виявлені негативні впливи карбендазиму на репродуктивну систему, встановлені тератогенні, генотоксичні та канцерогенні ефекти в лабораторних тварин [11-14].

Поступове накопичення даних окремих досліджень призвело до повторної оцінки ризиків застосування карбендазиму [13].

Попри припинення використання даної речовини у багатьох країнах світу [16-17], пестицидні препарати на його основі широко застосовуються в країнах Близького та Далекого Сходу, Латинській Америці, Великій Британії, деяких країнах Європейського Союзу [17-20]. В Україні на основі карбендазиму зареєстровані 26 препаративних форм фунгіцидів, переважно генериків [10].

Відомо, що пестициди несуть значне екологічне навантаження на навколишнє середовище, зокрема порушують біологічний баланс мікробіоти ґрунту та водних середовищ [21]. Карбендазим є порівняно стабільною сполукою з тривалим періодом напівжиття, що за різними даними складає від 20 днів до кількох місяців у ґрунті та до 25 місяців у водному середовищі [4]. Щодо знаходження в повітрі дослідження показали, що при застосуванні карбендазиму для обприскування не виникає стійких аерозолів [22]. Через низьку рухливість у ґрунті карбендазим накопичується переважно у верхньому шарі (3-5 см) [23, 24]. Екологічний вплив речовини на мікрофлору та мікрофауну ґрунту на сьогодні остаточно не вивчений.

Найбільш відомим негативним ефектом карбендазиму та його похідних є висока токсичність для водних організмів, зокрема риб [12, 15, 18]. Враховуючи тривалу стабільність карбендазиму у водному середовищі, надзвичайно важливою також є проблема вилучення його з природних водойм і систем водопостачання [25, 26].

Отже, на сьогодні особливої важливості набуває питання вивчення токсичних ефектів давно відомих пестицидів, зокрема широко вживаного в

Україні та світі фунгіциду карбендазиму. Розповсюдженість і стійкість речовини у навколишньому середовищі може стати причиною виникнення як потенційного, так і реального ризику небезпеки для здоров'я людини.

1.2. Токсикологічна характеристика, метаболізм, механізм біологічної і фунгіцидної дії карбендазиму

Карбендазим є порівняно стабільною сполукою в навколишньому середовищі, за відсутності взаємодії з живими організмами перетворюється шляхом фотодеградації у водних розчинах [27]. Трьома основними продуктами фотолізу є 2-амінобендазол, бензімідазолізоціанат і монокарбометокси-гуанідин, останній з яких є високостійкою сполукою, що може акумулюватися у навколишньому середовищі. Проте основним природним шляхом деградації карбендазиму залишається його метаболічне перетворення ферментами живих організмів.

Особливий інтерес для розуміння потенційного токсичного впливу карбендазиму при потраплянні з навколишнього середовища та з продуктами харчування становлять метаболічні шляхи перетворення даної речовини в організмі вищих рослин і тварин.

Оскільки карбендазим є системним фунгіцидом, він порівняно легко проникає в усі рослинні тканини після поверхневого нанесення, зберігається в малих дозах після передпосівної обробки насіння та може циркулювати в рослинах і плодах протягом досить тривалого часу – до 60 діб [28].

Остаточної схеми метаболізму карбендазиму в організмі рослин на сьогодні не створено, проте відомі основні метаболіти речовини, а також характер його впливу на деякі важливі ланки обміну речовин і регуляції рослин [29-32]. Основним метаболітом, що виявляється в тканинах рослин після обробки, є 2-амінобендазол, менш значимими за вмістом метаболітами – 5-гідроксикарбендазим і 5-гідроксиамін [33].

В останні десятиріччя питання щодо метаболізму карбендазиму у

тварин отримало нову актуальність та почало інтенсивно досліджуватися, частково через накопичення нових даних щодо негативних ефектів карбендазиму на організм, частково через зацікавленість до цитотоксичних властивостей цієї речовини з боку онкохіміотерапії та необхідність даних щодо фармакокінетики потенційного нового цитостатика [34, 35].

Біодоступність карбендазиму залежить від способу введення, а також природи супутніх речовин. Речовина є малорозчинною у воді та при оральному введенні у водних розчинах практично не всмоктується в кишечнику, проте при застосуванні в гліколевих та олійних розчинах його біодоступність складає до 85 % [36]. На сьогодні через інтерес до карбендазиму в якості протипухлинного цитостатика проблему низької біодоступності намагаються вирішити шляхом створення ліпосомальних препаратів [37].

При внутрішньовенному введенні метаболіти карбендазиму вже через 15 хв досягають найвищих концентрацій у печінці та нирках, а найвищий рівень незміненого карбендазиму зберігається в крові (82,8 % порівняно з 7,6 % і 5,7 % незміненого карбендазиму в печінці та нирках відповідно) [38]. Також відомо, що під час циркуляції в крові карбендазим має здатність зв'язуватися з білками плазми зі спорідненістю 60-74 % за умов концентрації речовини 0,2-125 мг/мл.

У ссавців метаболічні перетворення карбендазиму відбуваються в печінці та нирках [38-40] з утворенням основного метаболіту – метил-5-гідрокси-2-бензімідазолкарбамату (5-НВС), N-оксидів-5,6-гідрокси-2-бензімідазол карбамату (5,6-НОВС N-оксидів) [31, 38], невелику частку також складає інший метаболіт – 2-амінобензімідазол (2-АВ) [36].

Згідно з наявними на сьогодні даними досліджень на лабораторних тваринних, основними ефектами карбендазиму на метаболізм ссавців є зростання активності ферментів печінки та нирок, а також поява маркерів окисного стресу [41 - 44].

За дії карбендазиму у щурів спостерігається зростання в крові рівня

ферментів, що є маркерами функціональних порушень печінки – лужної фосфатази, аланін- та аспартатамінотрансферази [41].

Також спостерігали ознаки порушення жирового обміну – статистично достовірне збільшення рівня експресії генів диацилгліцеролацилтрансферази 1 та 2, що свідчило про надмірний синтез триацилгліцеролів у печінці [39].

Ще одним важливим, але маловивченим питанням є взаємодія карбендазиму з мікрофлорою шлунково-кишкового тракту. В одному з досліджень [39] було встановлено, що карбендазим при оральному введенні протягом 28 діб у дозах 100-500 мг/кг у мишей спричиняв не лише порушення ліпідного обміну печінки та зростання рівня маркерів запалення, але й значний зсув у складі мікрофлори кишечника – спостерігали зміни видової чисельності 361 таксономічної одиниці мікрофлори товстого кишечника.

Механізмом фунгіцидної дії бензімідазолів є вплив на цитоскелет, а саме високоспецифічне ковалентне зв'язування з β -тубуліновими субодиницями, що призводить до руйнування мікротрубочок і порушення мітозу. Ці сполуки ефективно інгібують розмноження збудників, що належать до аскоміцетів і базидіоміцетів, але не мають впливу на ооміцети через деякі відмінності в амінокислотному складі тубуліну [45].

Основною мішенню фунгіцидної дії карбендазиму є мікротрубочки, а саме бета-тубуліни. Тубуліни поділяють на родини α -, β -, γ -, δ -, ϵ - і η -тубулінів, з яких α - та β -тубуліни є основними компонентами мікротрубочок, відповідальними за процеси поділу клітини, внутрішньоклітинного транспорту та підтримання структури клітин [46]. Мікротрубочки формуються з гетеродимерів α - та β -тубулінів і перебувають у стані динамічної нестабільності, тобто постійно проходять періоди активної самозбірки та саморозпадання на протилежних “+” і “-” полюсах, а після цього – періоди затримки росту та розпадання.

Важливою характеристикою взаємодії карбендазиму з тубуліном є те, що карбендазим не здатний безпосередньо руйнувати вже сформовані

мікротрубочки [47-50]. Карбендазим блокує два основних механізми підтримання стабільності цитоскелета: самозбірку мікротрубочок і їхню динамічну нестабільність, тобто перехід від фази затримки росту до фази подовження. На клітинному рівні це проявляється як руйнування цитоскелета та розподіл вільного тубуліну в цитоплазмі, порушення розташування органел і розподілу клітини на компартменти. Згідно з більшістю наявних на сьогодні даних, основною мішенню карбендазиму є β (а саме $\beta 2$)-тубулін. Проте останніми дослідженнями було встановлено наступне: хоча в більшості видів фітопатогенних грибів мішенню дії карбендазиму дійсно є виключно $\beta 2$ -тубулін, у деяких видів, зокрема окремих представників роду *Fusarium*, сайти зв'язування карбендазиму знаходяться на молекулі $\beta 1$ -тубуліну [48]. Крім того, виявлено, що карбендазим інгібує полімеризацію $\alpha 1$ -/ $\beta 2$ -тубулінів та $\alpha 2$ -/ $\beta 2$ -тубулінів на $90,9 \pm 0,4$ % та $93,5 \pm 0,05$ % відповідно [47].

Отже, існуючі на сьогодні дані щодо взаємодії карбендазиму з тубуліном дозволяють зробити висновок щодо меншої специфічності зв'язування цих молекул, ніж вважалося в минулі роки, і більшої кількості супровідних явищ, що є наслідками конформаційних змін, не пов'язаних безпосередньо зі зв'язуванням карбендазиму з тубуліном. У цьому разі ще більшої актуальності набуває дослідження впливу карбендазиму на клітини людей і тварин, оскільки попри слабку спорідненість до тваринного тубуліну, можуть відмічатися інші важливі білкові взаємодії й епігенетичні ефекти.

1.3. Особливості токсичної дії карбендазиму на організм ссавців

Незважаючи на те, що LD50 карбендазиму для щурів при оральному введенні складає >10000 мг/кг [15], у перших же дослідженнях відносно органної токсичності було встановлено, що даний фунгіцид може спричиняти несприятливі ефекти для ссавців, зокрема гематологічні та біохімічні порушення, гістопатологічні зміни в тканинах печінки та нирок,

репродуктивна токсичність та ендокринні порушення [39, 51-54].

У дослідженні токсичних ефектів карбендазиму особливий інтерес представляє відстеження динаміки змін біохімічних і гематологічних показників, оскільки вони можуть відображати ушкодження різних органів і систем організму, дозволяють виявляти негативний вплив ксенобіотиків на ранніх стадіях.

Основними проявами органної токсичності карбендазиму є гепато- та нефротоксичність через їхню переважну роль у його метаболізмі. Через це першими змінами біохімічних показників крові після введення карбендазиму є зростання рівнів ферментів печінки – лужної фосфатази, аланін- та аспартатамінотрансферази. Було встановлене достовірне дозозалежне зростання в крові креатиніну та сечовини, що є маркерами функціонального порушення нирок, а також холестеролу, альбуміну [39, 51, 53]. У 2018 р. методом молекулярного докінгу було доведене зв'язування карбендазиму з альбуміном сироватки людини [55]. Крім того, при тривалому введенні карбендазиму (20-80 мг/кг упродовж 90 днів) спостерігали зміни концентрації глюкози та білірубину.

У щурів за дії карбендазиму (5-50 мМ) спостерігали дозозалежне зниження гематокриту (на 3-19 %) і кількості лейкоцитів (на 18-35 %), що супроводжувалося різким зростанням відсотка нейтрофілів [40]. Водночас відмічали підвищення кількості лімфоцитів (на 20 %) при низьких дозах карбендазиму та зменшення їхньої кількості (на 22 %) нижче контрольних значень при високих дозах речовини. В інших дослідженнях під впливом карбендазиму спостерігали зменшення кількості еритроцитів і гемоглобіну [56, 57].

У тканинах печінки та нирок після введення карбендазиму спостерігали ознаки окисного стресу, що проявлялися в зростанні та наступному зниженні рівнів глутатіону (в печінці) та малонового діальдегіду (в нирках) [41, 42].

За дії карбендазиму в печінці проявляються наступні зміни: стеатоз, гідропічна дистрофія та некроз окремих гепатоцитів [39, 51, 56, 58, 59]. Крім

того, в комбінації з іншими пестицидами карбендазим спричиняв пошкодження ДНК гепатоцитів, що виявляли методом ДНК-комет [58]. За результатами дослідження чутливість до пошкодження ДНК гепатоцитів залежала від статі та була достовірно вищою у самиць мишей.

У тканині печінки спостерігалися дилатація синусоїдів, повнокров'я портальних вен печінки, моноклеарна інфільтрація, збільшення кількості клітин Купфера [51]. За даними іншого експерименту [60], під впливом карбендазиму у високих дозах (1000 мг/кг) у печінці спостерігали порушення мікроциркуляції, крововиливи, порушення структури жовчовивідних протоків, гіпертрофію та зернисту дистрофію гепатоцитів.

Згідно з даними інших досліджень, вплив беномілу та його метаболіту карбендазиму призводив до зниження окисного потенціалу мікросом, що може бути пов'язане з основною роллю мікосомальних ферментів [38, 61] у знешкодженні карбендазиму.

Маловивченим є питання цитотоксичності карбендазиму для клітин дихальних шляхів, оскільки вдихання аерозолів є ще одним можливим шляхом потрапляння карбендазиму в організм. У літературі зустрічаються поодинокі повідомлення про зниження рухливості війчастих клітин епітелію слизових оболонок під впливом карбендазиму [62]. Відсутність вираженого токсичного впливу на дихальні шляхи в малих дозах пояснюють тим, що карбендазим є порівняно малорозчинним у водних розчинах і в дослідженнях мав невелику біодоступність для війчастих клітин.

Вплив карбендазиму на стан та функціонування ендокринної системи. Нині досить важливим є дослідження потенційної ендокринної активності пестицидів. Через зростання частоти випадків безпліддя, гормональних порушень і раку статевих залоз, що пов'язують з погіршенням загальної екологічної ситуації, на сьогодні діють окремі скринінгові програми для виявлення ендокринно-активних сполук [63, 64].

Перші дослідження ендокринно активних пестицидів були сконцентровані на виявленні ксеноестрогенів, проте останні праці дозволили

визначити все більшу кількість речовин з андрогенною активністю [65]. За оцінками наявних даних можна припустити, що карбендазим належить саме до останньої групи сполук.

На сьогодні механізм ендокринної активності карбендазиму є дослідженим не в повному обсязі. Останні отримані дані свідчать про те, що дана речовина може впливати як на гормональну чутливість клітин гонад, так і безпосередньо на синтез гормонів ендокринними залозами [65-67].

Виявлено його вплив на рівень гормонів гіпофізу [68], а також андроген-подібний ефект через пряму дію або збільшення андрогенних рецепторів.

Карбендазим може впливати на рівень тестостерону, лютеїнізуючого (ЛГ), фолікулостимулюючого (ФСГ) та гонадотропін-рилізингового гормонів, проте існуючі на сьогодні дані різних досліджень є неоднозначними [68-71]. У субхронічному дослідженні при впливі карбендазиму на щурів у дозах 50-400 мг/кг спостерігали дозозалежне зростання рівнів ФСГ та ЛГ у сироватці крові [67]. Водночас рівні пролактину та гормонів щитоподібної залози в сироватці крові, гонадотропін-рилізингового гормона в гіпоталамусі залишалися незмінними.

Згідно з даними іншого дослідження, введення карбендазиму впродовж 80 днів (20-200 мг/кг) призводило до зниження рівня ЛГ, але не впливало на концентрацію тестостерону та ФСГ [69].

У дослідженні короткострокового (48 год) впливу карбендазиму у дозі 25 мг/кг у сироватці крові щурів достовірно зменшувався рівень тестостерону [70].

Можливою причиною розходження даних щодо впливу карбендазиму на концентрації гормонів є те, що такі зміни не завжди можна адекватно відстежити через саморегуляцію ендокринної системи за принципом компенсаторної петлі [68-73]. Попри суперечливі результати щодо ендокринної токсичності карбендазиму, наявні на сьогодні дані дозволяють зробити висновок, що дана речовина впливає на регуляцію гіпоталамо-

гіпофізарно-гонадної осі.

Доведено, що репродуктивну токсичність карбендазиму можна компенсувати при одночасному введенні антагоністів до андрогенів [68]. У дослідженнях щодо репродуктивної токсичності карбендазиму в щурів (у дозах 25-800 мг/кг протягом 56 днів) було доведено, що негативні впливи карбендазиму на статеву систему, як-от деструктивні зміни сім'яних каналців і порушення сперматогенезу, повністю компенсувалися при одночасному введенні антагоніста андрогенних рецепторів – флутаміду. При введенні лише карбендазиму в групі вагітних самиць спостерігали деякі андроген-подібні ефекти в нащадків жіночої статі, а саме неповний розвиток матки та в декількох випадках відсутність вагіни [73].

На сьогодні існують окремі дані у дослідженнях *in vitro* [73] щодо специфічного зв'язування карбендазиму з андрогенними рецепторами чутливих клітин і конкуренція з тестостероном. Даний ефект може призводити до початкового зростання концентрації вільного тестостерону, а після виведення його з крові – відповідного збільшення концентрації ФСГ та ЛГ за механізмом зворотної регуляції, синтезу нової дози тестостерону. Водночас, оскільки карбендазим зв'язує рецептори андроген-чутливих клітин, процес сперматогенезу не стимулюється, а коливання рівнів гормонів призводять до гормонального дисбалансу [73-76].

Іншим наслідком впливу карбендазиму було різке зростання синтезу клітинами Сертолі андроген-зв'язуючого білка (АЗБ) [77]. Цей ефект пов'язують з андроген-подібним впливом карбендазиму та його конкурентним зв'язуванням з андрогенними рецепторами. В результаті зростає концентрація вільного тестостерону, наслідком чого є порушення гормонального балансу та компенсаторне підвищення синтезу АЗБ. Водночас впливу карбендазиму на синтез клітинами Сертолі інгібіну Б та фактора стовбурових клітин не спостерігали [77].

За результатами досліджень *in vitro* було зроблене припущення, що карбендазим може викликати надмірну фемінізацію через його стимулюючий

вплив на активність ароматази – фермент, що відповідає за перетворення андрогенів у естрогени шляхом гідроксилювання. Зокрема, підвищення активності ароматази спостерігали в дослідженнях щодо цитотоксичності карбендазиму на клітинних лініях молочної залози (MCF-7) [71] та гранульозоклітинній пухлині яєчника (KGN) [72]. Проте дослідження *in vivo* не підтвердили фемінізацію під впливом карбендазиму [68, 72].

Обмежені дані існують щодо впливу карбендазиму на інші ендокринні залози, зокрема тимус. В одному з досліджень у щурів було зафіксоване зниження маси тимуса в піддослідних групах тварин незалежно від статі. При введенні карбендазиму щурам упродовж 15 тижнів у дозах 300 та 600 мг/кг спостерігали зменшення маси залози, набряк і розростання фіброзної тканини, збільшення щільності фібронектину [78].

Дослідження не довели наявності у карбендазиму (доза 800 мг/кг) антиестрогенного ефекту, проте описаний у літературі андроген-подібний вплив речовини потенційно може мати негативні наслідки на гормональний баланс у жіночому організмі [68, 73].

Зважаючи на доведену репродуктивну токсичність і вплив на гормональну активність, карбендазим був визнаний як ендокринно-активна сполука з присвоєнням відповідної категорії ризику [15], проте механізм його впливу на гормональну регуляцію організму не є остаточно дослідженим [68].

Дія карбендазиму на органи репродуктивної системи. Репродуктивна токсичність є найбільш детально дослідженим токсичним ефектом карбендазиму. Згідно з директивою Європейського Союзу 67/548/ЕЕС [54], карбендазим був віднесений до класів R46 (генетичні порушення, що успадковуються), R60 (порушення фертильності), R61 (фетотоксин). За класифікацією CLP (The European Regulation on the Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures) [79] він належить до репродуктивних токсикантів 1Б – сполуки, ризик репродуктивної токсичності яких базується на результатах досліджень на лабораторних тваринах. Дані

щодо впливу на людину на сьогодні обмежені [80].

Вплив на гаметогенез. Як відомо, основним механізмом токсичного впливу карбендазиму є його зв'язування з тубуліном і порушення полімеризації мікротрубочок. Даний ефект відіграє важливу роль у репродуктивній токсичності речовини, оскільки процес збірки мікротрубочок є критично важливим на багатьох етапах гаметогенезу.

Карбендазим спричиняє швидкий вплив на процес мейозу статевих клітин і латентний – на дозріваючі клітини [81]. Під час мейозу внаслідок взаємодії речовини з тубуліном порушується процес нормального розходження хромосом [77], пізніше це може призводити до інгібування дозрівання гамет, безпліддя та викиднів, а в разі запліднення – до ембріональної смертності та порушень розвитку.

Вплив на чоловічу статеву систему. Основними відомими ефектами речовини є морфологічні порушення дозріваючих сперматид, десквамація сперматогенного епітелію, пригнічення сперматогенезу, зниження ваги тестикул і рівня тестостерону, кількості сперматозоїдів і фертильності [70, 81-87].

Важливою мішенню карбендазиму в репродуктивній системі є клітини Сертолі, що виконують секреторну та підтримуючу [52, 84] функції. Вагомим ефектом, що спостерігали під впливом речовини, було заміщення клітин Сертолі жировими включеннями, що призводило до незворотного порушення структури сперматогенного епітелію [85].

У дослідженні за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг була доведена здатність речовини впливати на клітини Лейдига. Показане достовірне зниження активності ферментів цих клітин, що беруть участь у синтезі стероїдних гормонів (3-бета-гідроксистероїд-дегірогеназа та 17-бета-гідроксистероїд-дегірогеназа), а також ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, гамма-глутамілтрансфераза, глюкоза-6-фосфатдегірогеназа) [70].

Також існують дані про те, що карбендазим інгібує синтез регуляторного білка стероїдів (StAR) клітинами Лейдига з відповідним зниженням активності стероїдогенних ферментів [86].

Вплив на жіночу статеву систему. Основний ризик токсичності карбендазиму на жіночу статеву систему спостерігається за умов впливу під час вагітності, особливо на ранніх строках. У дослідженнях на моделях лабораторних тварин серед відомих на сьогодні ефектів речовини на репродуктивну систему самиць відмічалися зниження індексу частоти вагітності, маси матки та зростання частоти викиднів [68]. Було показано, що при контакті з карбендазимом навіть одноразова експозиція може спричинити ранню втрату вагітності через анеуплоїдію ооцитів [88-91]. Також відомо, що на моделі псевдовагітних щурів речовина інгібувала проліферацію тканин, що моделювали плаценту [92].

Хоча даних щодо впливу карбендазиму на перебіг вагітності в людей нині немає, наявні результати досліджень на клітинних моделях. Доведено, що речовина проявляє цитотоксичний вплив на клітини трофобласту людської плаценти (HTR-8) та індукує апоптоз. Крім того, спостерігали зниження експресії протеаз і молекул адгезії (інтегринів), що призводило до зменшення міграції клітин у культурі [92]. Карбендазим при експозиції 48 год у дозах 10^{-6} – 10^{-4} М інгібував проліферацію клітин ендометрію людини *in vitro* на 27,3-29,6 % [88].

Ембріотоксичність. Карбендазим належить до пестицидів, що можуть проникати через плаценту за рахунок інгібування ефлюксного транспортера – білка ABCG2, що виконує фетопротективну функцію в плаценті [93], що становить загрозу не лише репродуктивної, але й ембріотоксичності.

У дослідженні на моделі трьох ліній стовбурових клітин (ембріональний тест) [94] карбендазим був з високою вірогідністю класифікований як “сильний ембріотоксин”. В іншій роботі він проявляв цитотоксичність до культур тканин 10-ти та 13-денних ембріонів мишей і

щурів відповідно [95].

Токсичність карбендазиму для плоду та вагітних самиць була доведена в дослідженнях на моделях щурів, мишей, кролів і хом'яків. За умов впливу речовини під час вагітності спостерігали затримку й аномалії розвитку, включаючи деформації скелета та морфологічні порушення [96]. Карбендазим у дозі 35 мг/кг викликав дефекти розвитку плоду, як-от енцефалоцеле, пупкова грижа, відсутність або вкорочення хвоста, вісцеральні порушення, патології нирок (у 28 %) і мозку (у 6 %). Серед скелетних порушень (у 41 % ембріонів) найчастіше спостерігали деформації ребер та хребців, затримку осифікації [97].

Важливими моделями для виявлення ембріотоксичності карбендазиму є риби та земноводні, оскільки через його вищу токсичність для цих організмів, ніж для ссавців, вони набагато чутливіші й до тератогенних ефектів даної речовини [98]. Отримані в таких дослідженнях ембріотоксичні ефекти близькі до результатів, одержаних на моделях ссавців. За таких умов основною мішенню ембріотоксичної дії карбендазиму, як і в ссавців, є розвиток скелета, мозку, очей і нирок [98, 99].

Доза, за якої відсутні прояви токсичного впливу речовини (NOEL) для ембріотоксичності карбендазиму є найнижчим з усіх аналогічних показників для даної речовини. Токсичність для ембріонів проявляється в дозі від 10 мг/кг (для щурів і кролів) [15]. Водночас рівень NOEL загальної токсичності становить 163 мг/кг (для щурів). Отже, репродуктивна токсичність та ембріотоксичність карбендазиму є найбільш небезпечними токсичними ефектами та можуть проявлятися під впливом малих доз речовини.

Особливості функціонування імунної системи під впливом карбендазиму. Відомо, що пестициди можуть спричиняти значний негативний вплив на імунну систему людини та тварин, а також комах [100], знижувати імунокомпетентність і призводити до розвитку порушень імунної системи і низки захворювань [70, 101-111].

Пестициди карбаматної групи можуть мати прямий чи непрямий вплив

на лімфоїдні органи, діяти на синтез імуноглобулінів, кооперацію імунних клітин, призводячи до імуносупресії [112], викликати апоптоз Т-лімфоцитів [113] і пригнічувати лізосомальну активність макрофагів [114].

Іншим важливим результатом досліджень впливу карбендазиму на імунну систему є дія на набутий імунітет. Доведено, що за умов впливу речовини (200 ppm упродовж 6 місяців) відбувалося пригнічення імунної відповіді в попередньо вакцинованих проти збудника курчат [115]. Спостерігали зниження проліферації В-лімфоцитів після антигенної стимуляції, тобто відповіді на збудник (на 21 %), зменшення концентрації IgA в сироватці крові (на 28,8 %) та середнього рівня гамма-глобулінів (на 18 %) що свідчило про значне пригнічення гуморального імунітету карбендазимом у низьких дозах.

Отже, негативним наслідком тривалого вживання карбендазиму навіть у малих дозах може бути зниження стійкості організму до збудників та ослаблення імунітету, набутого під час вакцинації.

Відомо, що інші пестициди карбаматної групи також можуть значно пригнічувати стійкість імунної системи до збудників, шляхом різних механізмів [116-119].

Під час дослідження впливу карбендазиму на клітини імунної системи особливий інтерес представляють печінкові макрофаги (клітини Купфера), оскільки печінка є основним органом його метаболізму. Доведено, що інкубація клітин Купфера щурів з карбендазимом уже в дозі 100 мкМ достовірно знижувала здатність макрофагів до синтезу сполук-медіаторів запалення (оксид азоту та TNF- α) на 46 % і 48 % відповідно, навіть в умовах стимуляції ліпополісахаридом [53]. Після інкубації з речовиною макрофаги майже вдвічі зменшували фагоцитарну активність. Отже, карбендазим має здатність впливати на макрофаги та знижувати їхні захисні властивості, хоча детальний механізм даного ефекту на сьогодні не досліджений.

Аналогічні результати спостерігали при інкубації цієї речовини з перитонеальними макрофагами мишей. Карбендазим у низьких

концентраціях (0,001 M) стимулював лізосомальні ферменти макрофагів, зокрема лужну фосфатазу, а у високих дозах, навпаки, пригнічував активність ферментів (>58 %). Речовина спричиняла дозозалежний утиск синтезу прозапальних цитокінів IL-1 β , TNF- α , а також активних форм азоту в перитонеальних макрофагів. Виявлений ефект інгібування прозапальної функції макрофагів може бути інтегральною ланкою імуносупресії під впливом карбендазиму [114].

1.4. Генотоксичні, цитотоксичні та канцерогенні ефекти карбендазиму

Основні цито- та генотоксичні ефекти карбендазиму пов'язані з впливом на веретено поділу за рахунок антимікротрубочкової активності речовини й, як наслідок, порушення розходження хромосом, аномалії мітозу та нерозходження клітин після поділу.

При тому, що спорідненість карбендазиму до тубуліну рослин і ссавців вважається набагато нижчою, ніж до тубуліну грибів, структура тубуліну в усіх еукаріотів є досить консервативною та на 75 % співпадає. Основні відмінності знаходять у неструктурованих С-термінальних ділянках молекули, де вони впливають на зв'язування з білками, асоційованими з мікротрубочками, але не сприяють змінам самих мікротрубочок [120].

Ефект карбендазиму часто порівнюють з іншим антимітотичним агентом – колхіцином. Довгий час вважалося, що карбендазим зв'язується з тубуліном у тому ж сайті, що й колхіцин, і конкурує з ним. Проте в дослідженнях 2008 р. було встановлено [47, 121], що карбендазим і колхіцин синергічно взаємодіють при пригніченні мітозу в клітин лінії HeLa, а за допомогою ядерної магнітно-резонансної спектроскопії виявлено, що ці дві сполуки приєднуються до тубуліну тварин у різних сайтах.

У більшості досліджень показано, що карбендазим спричиняє анеугенну, але не мутагенну активність. Проте в деяких роботах у тесті

Еймса [122] промислові препарати карбендазиму у високих дозах індукували появу точкових мутацій чи зсуву рамки зчитування. А втім під час подальшого вивчення було встановлено, що сам карбендазим, як і його основний метаболіт метилкарбамат у готових препаративних формах (5-ОН МВС), не мав мутагенних властивостей, натомість отримані ефекти були спричинені домішками карбендазиму – 2,3-діамінофеназином і 2-аміно-3-гідроксифеназином [122].

Основні дослідження аномалій мітозу, що виникають під впливом карбендазиму, були проведені на рослинних моделях [123-127]. Спостерігали зниження мітотичного індексу, а також появу різноманітних хромосомних порушень при мітозі (злипання хромосом, дезорієнтація метафази й анафази, затримка стадій мітозу, виникнення хромосомних містків, наявність трьох і більше полюсів при поділі, дво- та багатоядерні клітини в результаті нерозходження клітин тощо).

Хромосомні містки, що утворюються під впливом карбендазиму, можуть бути наслідком злипання та дицентризму хромосом, а містки зі свого боку призводять до розривів і фрагментації хромосом. Порушення або розформування веретена поділу є причиною мультиполярності та дезорієнтації хромосом, абнормальних стадій мітозу, прискорення чи затримки розходження хромосом [125]. Подібні результати, а саме порушення веретена поділу, аномальні мітози, утворення багатоядерних клітин, були виявлені за дії карбендазиму в клітинах людини та тварин [50, 131].

Важливим маркером генотоксичності карбендазиму є мікроядерна індукція (табл. 1.1). Доведено, що речовина може стимулювати появу мікроядер у кістковому мозку мишей (доза 1646-3293 мг/кг). Водночас у тварин у 87 % випадків поліхроматофільні еритроцити містили мікроядра типу K⁺ (кінетохоропозитивні), що свідчило про втрату хромосом під час поділу та було індикатором анеугенної дії [128, 132].

**Генотоксичні ефекти карбендазиму, виявлені в культурі клітин і
тканинах ссавців за даними різних дослідників**

Лінія клітин/тканина/лі- нія тварин	Досліджені дози карбендазиму, мг/кг	Мінімальна ефективна доза карбендазиму, мг/кг	Отриманий ефект	Джерело
Лімфоцити людини	0,16-10,46 μ M	2,62 μ M	Мікроядерна індукція	[129]
Лімфоцити людини	21-50000 нг/мл	600 нг/мл	Нерозходження хромосоми 17, X	[130]
Ооцити мишей CF-1	0, 3, 10, 30 μ M	30 μ M	Порушення мітозу	[131]
Кістковий мозок мишей B6D2F1 (♂,♀)	66, 1646 або 3293 мг/кг орально	1646 мг/кг	Мікроядерна індукція	[132]
Кістковий мозок щурів Wistar	150-300 мг/кг орально	150 мг/кг	Мікроядерна індукція	[133]
Клітини епітелію кишківника мишей Swiss	500 або 1000 мг/кг орально	500 мг/кг	Мікроядерна індукція	[134]
Сперматиди щурів Sprague- Dawley	50, 100 або 400 мг/кг орально	100 мг/кг	Мікроядерна індукція	[82]
Культура клітин NRK52E	0-900 μ M	112,5 μ M	Генотоксичність, вплив на ДНК	[135]

Культура клітин людських лімфоцитів також є високочутливою до анеугенної дії карбендазиму. Під впливом речовини спостерігали позитивні

результати в мікроядерному тесті (появу центромервмісних ядерцець) вже за дії карбендазиму в дозі 2,62 μM [129].

Дослідження потенційної генотоксичної дії карбендазиму проводили на хросомомах (вивчали хромосомні пари 1-8, 11-18, X-17) [130]. Усі виявлені порушення класифікували як анеуплоїдні – втрату/появу додаткових хромосом, нерозходження хромосом чи поліплоїдію, а також утворення центромер-позитивних мікроядер. Генотоксична дія карбендазиму була дозозалежною та проявлялася в дозах від 10 мкг/мл (водночас аналогічні ефекти для беномілу спостерігали в дозах від 20 мкг/мл). Слід зазначити, що виявлені цитогенетичні ефекти, спричинені карбендазимом, були пороговими.

Іншим наслідком, крім прямого впливу речовини на веретено поділу та пов'язаних із цим генетичних порушень, є епігенетична дія даної речовини.

Важливими епігенетичними модифікаціями, що можуть призводити до фенотипових змін, є метилювання та деметилювання ДНК, що має вплив на експресію генів, адаптацію до стресових умов і формування гетерозису. Ба більше, метилювання ДНК є порівняно стабільною епігенетичною зміною та може бути успадковане соматичними чи статевими клітинами. Доведено, що карбендазим може впливати на ці процеси. У 2015 р. на моделі *Arabidopsis thaliana* [123] було проведене одне з перших досліджень епігенетичного впливу карбендазиму на рослини. Встановлено, що речовина спричиняла зміни в метилюванні/деметилюванні геномної ДНК та впливав на профіль експресії окремих генів. Дія карбендазиму призводила до метилювання та деметилювання факторів транскрипції серед інших генів. Загалом у 2-х дослідних групах рослин у присутності речовини були деметильовані 20 і 39 генів зі зростанням їхньої експресії в 3 рази, 21 і 24 гени були метильовані зі зниженням їхньої активності також утричі.

У літературі наявні поодинокі дані щодо інгібування гістондеацетилази [71]. Також виявлено, що порівняно з іншими генотоксичними агентами за загальним профілем активності карбендазим є найближчим до групи

інгібіторів топоізомераз, зокрема до мітоксантрону [136]; крім того, важливою є властивість речовини спричиняти епігенетичний вплив за рахунок деметиляції ДНК й окисного стресу.

Відомо, що вплив карбендазиму призводить до розвитку пухлин печінки в мишей ліній CD-1 і Swiss [137-139]. Експерти ЕРА класифікували його як можливий канцероген для людини (група С) [137]. В Європейському Союзі карбендазим не класифікують як канцероген, а виникнення пухлин у мишей вважається видоспецифічним і нерелевантними для людини [15]. Водночас основні дослідження канцерогенності цієї речовини *in vivo* були проведені в 1970-1980-х рр. Наприклад, вивчали активність індукування лімфом за впливу карбендазиму (доза 500 мг/кг) у мишей при його введенні під час вагітності тварин [140]. Було встановлено, що сама собою речовина не викликала розвитку лімфом, але виявляла активність при введенні одночасно з нітритом натрію (5x500 мг/кг + 0,05 %), тобто набувала канцерогенних властивостей у N-нітрозформах, що виникали *in vivo*. При введенні карбендазиму в комплексі з нітритом натрію під час всього періоду вагітності злоякісні новоутворення розвивалися в 70 % новонароджених тварин. Окрім того, в нащадків піддослідної групи спостерігали зниження маси тіла, зростання кількості лімфоцитів, інфільтрацію лімфобластами тимуса, печінки, нирок, кісткового мозку. Можливим поясненням механізму канцерогенної дії таких сполук була активація онкорнавірусів. Водночас як карбендазим, так і нітрит натрію при аналогічному введенні окремо не спричиняли розвитку лімфом у нащадків. Отже, азотвмісні сполуки карбендазиму, що можуть формуватися при взаємодії з іншими речовинами в докільлі та безпосередньо в організмі, мають можливість спричиняти канцерогенну дію в лімфоїдних органах.

Відомі на сьогодні дослідження канцерогенного потенціалу карбендазиму були проведені в період його випуску на ринок (70-80 рр. XX сторіччя) на мишах (3 лінії) та щурах (2 лінії) [13, 14, 33, 74].

Достовірний онкогенний ефект цієї речовини був виявлений на мишах

лінії Swiss. При застосуванні карбендазиму в групі з 200 тварин (самці та самиці мишей у рівній кількості) в дозах 0, 150, 300 та 1000 ppm (зі збільшенням дози під час дослідження до 5000 ppm) упродовж 80 тижнів спостерігали зростання ваги печінки, а також збільшення частоти гепатоцелюлярних аденом і гепатокарцином порівняно з контрольною групою в тварин обох статей. У самців відмічали більш виражений онкогенний ефект і зростання частоти появи злоякісних пухлин печінки – гепатокарцином. Був зроблений висновок, що карбендазим є онкогеном для даної лінії мишей за добової дози 5000 ppm [13].

У дослідженнях, проведених у групах з 80 самців і самиць мишей лінії CD-1, вивчали вплив карбендазиму в дозах 0, 500, 1500, або 7500 ppm за умов довготривалого впливу впродовж 2 років. Спостерігали високий рівень смертності самців за впливу високої дози речовини (7500 ppm) (60 % загиблих тварин на 66-й тиждень дослідження проти 22,5 % у контрольній групі), водночас подібний результат не відмічався у самиць. Загальними ефектами, що спостерігали у тварин обох статей, були зменшення ваги тимуса та нирок, зростання ваги печінки. У дозах 1500 і 7500 ppm карбендазим спричиняв значний гепатотоксичний вплив – центрилобулярну гіпертрофію та некроз гепатоцитів, набряк, а також появу новоутворень. Спостерігали достовірне зростання частоти гепатокарцином у дозі 1500 ppm у самців, достовірне збільшення комбінованої частоти гепатоаденом, гепатокарцином і гепатобластом у середніх дозах у самців, усіх дозах у самиць. Для самців розрахунок онкогенного ефекту був можливий лише за дії середньої дози речовини (до 1500 ppm) через високий рівень смертності тварин при високих дозах.

Отже, було підтверджене дозозалежне зростання частоти появи гепатокарцином під впливом карбендазиму за відсутності супутнього онкогенного ефекту в інших тканинах, крім печінки [74].

Вплив карбендазиму також був досліджений на іншій лінії мишей – NMRKf [13]. Експеримент проводили впродовж 96 днів з оральним введенням тваринам речовини в добових дозах 0, 50, 150, 300, 1000 ppm зі

збільшенням дози до 2000 ppm після 4-го тижня, до 5000 ppm після 8-го тижня дослідження. Розмір вибірки в даному дослідженні складав 100-120 тварин різної статі.

Під час проведення досліду не спостерігали значного зростання смертності в піддослідних групах мишей NMRKf порівняно з контрольною, на відміну від результатів, отриманих на лінії CD-1. Подібними ефектами було збільшення абсолютної ваги печінки (в дозі 5000 ppm), а також центрилобулярна дистрофія, некроз гепатоцитів, пігментація клітин Купфера, збільшення ядер гепатоцитів з появою включень, наявність гепатоцитів з просвітленою цитоплазмою.

Як у контрольних, так і в дослідних групах тварин спостерігали близький рівень новоутворень печінки, як-от аденоми, карциноми, фібросаркоми тощо; проте появу гемангіом у печінці відмічали в усіх дослідних групах тварин, але не в контролі. Проте в результаті проведених досліджень не було виявлено дозової залежності щодо частоти появи пухлин, розподілу злоякісних і доброякісних новоутворень. Встановлений на цій лінії мишей рівень NOEL карбендазиму складав 300 ppm, що еквівалентно 45 мг/кг на день [13].

Інші результати були отримані під час вивчення впливу карбендазиму на щурах. У дослідженнях, проведених на лініях Sprague-Dawley і Wistar, застосування речовини в дозах 0, 100, 500, 2500 і 5000 ppm упродовж 104 тижнів (лінія Sprague-Dawley) [13] та 0, 150, 300 чи 2000 ppm зі збільшенням до 10000 ppm протягом 2 років (Wistar) [13] не призводило до дозозалежного онкогенного ефекту, який би достовірно перевищував контрольний рівень. Наслідками, пов'язаними з впливом речовини, були зниження абсолютної маси тіла тварин, зростання маси печінки, зменшення гематокриту та гемоглобіну, а також атрофія тканин сім'яників. У дослідних групах також спостерігали збільшення частоти дифузної проліферації парафолікулярних клітин щитоподібної залози в самиць щурів, які отримували високі дози речовини. Впливу карбендазиму на рівень смертності щурів порівняно з контролем не відмічали. Доза, при якій не спостерігається несприятливого

ефекту (NOAEL), для щурів на основі змін у органах і біохімічних показників був визначений як 300 ppm, що еквівалентно 15 мг/кг на день [74].

При порівнянні ефекту карбендазиму щодо різних видів тварин був зроблений висновок, що саме миші є найбільш чутливими до впливу даного фунгіциду. Наприклад, відповідний NOEL при хронічному дослідженні на собаках [14] був значно нижчим і складав 2,5 мг/кг, через що було підсумовано, що отримані результати щодо канцерогенності в мишей неможливо прямо екстраполювати на більших ссавців [59].

Оскільки даних стосовно канцерогенності карбендазиму на сьогодні недостатньо та достовірно встановленою є лише поява пухлин у печінці ліній мишей, схильних до спонтанного виникнення новоутворень, доцільним є врахування даних щодо канцерогенності близьких за будовою сполук групи бензімідазольних фунгіцидів – беномілу та тіофанат-метилу, метаболітом якого є карбендазим. Попри невелику кількість досліджень, проведених щодо цих речовин, співставлення наявних на сьогодні даних може бути корисним при оцінці та прогнозуванні потенційних канцерогенних ефектів карбендазиму, що наразі ще не виявлені та не доведені. Так, за даними наведеними IPSC INCHEM Report [74, 141, 142], за дії беномілу у мишей лінії CD-1 (доза: 0, 500, 1500, та 5000 ppm; вплив 24 міс.) виявлено гепатоаденоми, гепатокарциноми; за дії тіофанат-метилу у мишей лінії CD-1 (доза: 0, 150, 640, 3000, та 7000 ppm; вплив 18 міс.) - гепатоаденоми, гепатокарциноми, гепатобластоми, у щурів лінії Fischer 344 (доза: 0, 75, 200, 1200, та 6000 ppm; вплив 24 міс.) - лейкемія, фолікулярні аденоми щитоподібної залози; за дії карбендазиму у мишей лінії Swiss (доза: 0, 150, 300, та 1000 ppm; вплив 80 тижнів) - гепатоаденоми, гепатокарциноми, у мишей лінії CD-1 (доза: 0, 500, 1500 або 7500 ppm; вплив 24 міс) - гепатоаденоми, гепатокарциноми, гепатобластоми; у мишей лінії NMRKf (доза: 0, 50, 150, 300, та 1000 ppm; вплив 96 тижнів) гемангіоми печінки. При порівнянні цих *in vivo* досліджень стає очевидним, що для всіх трьох речовин спільною мішенню канцерогенного впливу є печінка. Водночас найбільша кількість типів

пухлин була виявлена саме при застосуванні карбендазиму.

Потенційними мішенями канцерогенного впливу, що на сьогодні для карбендазиму не досліджені повною мірою, є лімфатична система та щитоподібна залоза. Нині розвиток лімфом під впливом цієї речовини відомий лише на тлі супутнього застосування нітриту натрію, тимчасом як тіофанат-метил може призводити до розвитку лейкемії у щурів. Крім того, для тіофанат-метилу встановлений онкогенний вплив на щитоподібну залозу щурів, що не підтверджений для карбендазиму, проте також потребує подальшого дослідження в якості потенційної мішені даної речовини.

Інший потенційний механізм канцерогенної дії карбендазиму був виявлений у дослідженнях 2018 р. [143]. Відомо, що важливою ланкою процесу канцерогенезу є виживання клітин з пошкодженнями в ДНК, що дає можливість проліферації клітин з мутаціями. Одним зі значущих регуляторів цього процесу є ядерний фактор транскрипції κB (NF- κB), що сприяє виживанню клітин з мутаціями за рахунок стимулювання експресії антигенів апоптозу [144, 145]. Крім того, даний фактор транскрипції є ключовим у регуляції імунної відповіді та пов'язаний із затяжними запальними процесами та зростанням рівня NF- κB -регульованих цитокінів, які зі свого боку стимулюють прогресію пухлин [146]. Активація фактора NF- κB може відбуватися за умов генотоксичного стресу, тригером якого можуть бути, зокрема, подвійні розриви ланцюга ДНК, або як наслідок стимуляції деякими чужорідними генотоксичними агентами [147]. У дослідженнях стимулюючого впливу на NF- κB , проведених на лінії ембріональних клітин нирки людини HEK/293, серед 14 хімічних сполук лише карбендазим призводив до активації NF- κB у дозах, в яких не проявлялася його цитотоксичність. Можливим механізмом впливу цієї речовини на даний фактор транскрипції є його епігенетична активність, а саме вплив на процеси метилювання/деметилювання. Отримані дані свідчать про ймовірність стимуляції виживання клітин з мутаціями за умови впливу карбендазиму [148].

Підсумок нині існуючих механізмів генотоксичної дії карбендазиму, за даними різних авторів, що потенційно можуть призводити до розвитку новоутворень, схематично наведений на рис. 1.1.

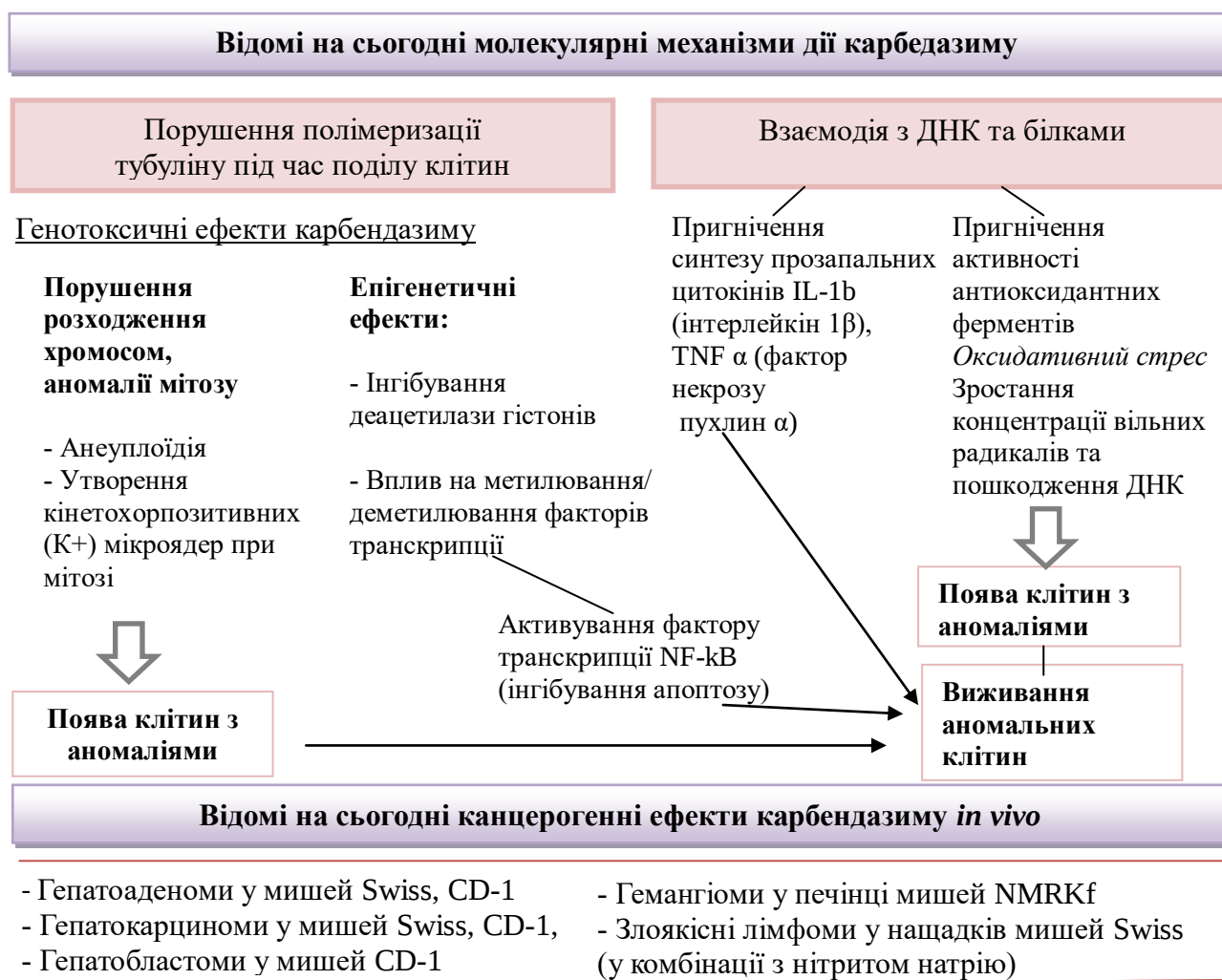


Рис. 1.1. Схема можливого взаємозв'язку між відомими на сьогодні молекулярними механізмами впливу карбендазиму та канцерогенезом.

Наразі не створено чіткої схеми взаємозв'язку між встановленими молекулярними механізмами дії речовини на білки, ДНК та проявами канцерогенної дії в організмі тварин, дані про які досить обмежені. Відомо, що порушення ДНК під впливом карбендазиму переважно спричинене аномаліями мітозу через пригнічення збірки мікротрубочок; також встановлені епігенетичні механізми дії: інгібування деацетилази гістонів [71] і вплив на метилювання факторів транскрипції [123], а також дія на експресію прозапальних цитокінів [114, 149]. Важливе значення також може

мати оксидативний стрес, спричинений цією речовиною [70].

Підсумовуючи результати опублікованих даних літератури щодо характеру та особливостей токсичної дії карбендазиму слід зазначити, що за параметрами гострої токсичності препарат проявляє гепатотоксичні та нефротоксичні властивості, впливає на гематологічні та біохімічні показники крові. З-поміж віддалених наслідків дії особливо небезпечними є експериментально доведені генотоксичність та репродуктивна токсичність карбендазиму, що здатні проявлятися на рівні низьких доз, призводити до порушень росту та розвитку, дисгормональних розладів тощо. Разом з тим, проведені дослідження впливу карбендазиму на ендокринну систему дозволяють констатувати наявність впливу, але недостатні для розуміння патогенезу ендокринпошкоджуючої дії та потребують подальшого вивчення. Необхідність подальших досліджень ендокринно-активної речовини обумовлена також тим, що зміни гормонального балансу є підґрунтям для розвитку дисгормональних неоплазій, насамперед, в органах ендокринної та статеві системи. Проте, питання канцерогенності карбендазиму досі остаточно не вирішене. Дані щодо його онкогенного потенціалу розрізнені та неоднозначні. Основні *in vivo* дослідження канцерогенної дії карбендазиму застарілі, більшість з них у літературі наведена у вигляді посилань на не опубліковані звіти, що не дозволяє достовірно оцінити рівень онкогенної небезпеки карбендазиму.

Чистота технічного продукту та вміст технологічних домішок, особливо токсикологічно релевантних, здатні суттєво впливати на токсичні ефекти карбендазиму, зокрема, на генотоксичність і, відповідно, канцерогенність.

Таким чином, багатотонажне використання карбендазиму, гено- та гепатотоксичність, ембріо- та репродуктивна токсичність, неоднозначність його впливу на ендокринну систему та канцерогенез є вагомою підставою для поглибленого, детального та систематизованого дослідження канцерогенності актуальних на сьогодні препаратів на основі карбендазиму.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та біологічні моделі

Експериментальні дослідження були проведені на базі ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України” (м. Київ).

Дослідження виконані відповідно до вимог OECD 451, рекомендацій IARC та іншої нормативної та методичної документації [150-170]. Дизайн дослідження представлений на рис. 2.1.

Тестова субстанція. Карбендазим – метил бензімідазол-2-ілкарбамат (PUPAC); метил Н-бензімідазол-2-ілкарбамат (CA). У роботі *in vivo* були досліджені властивості генеричного 98 % карбендазиму. Зразки карбендазиму за вмістом діючої речовини та токсикологічно значущих домішок відповідали вимогам специфікації ФАО/ВООЗ для пестицидів. Вміст генотоксичних домішок: 2,3-діамінофеназин і 2-аміно-3-гідроксифеназин не перевищували 0,003 і 0,0005 г/кг відповідно [157].

Тварини. Щури породи Wistar:

- для ідентифікації канцерогенності карбендазиму за умов хронічної пероральної інтоксикації були використані 560 щурів Wistar (280 самців і 280 самиць) із середньою масою тіла самців (129 ± 22) г, самиць – (118 ± 18) г;
- для оцінки токсичного впливу карбендазиму на показники периферичної крові за умов гострої пероральної інтоксикації – 6 щурів-самців з масою тіла 200-250 г;
- у роботі з дослідження впливу токсичності карбендазиму на показники периферичної крові в умовах хронічної пероральної інтоксикації – 40 щурів Wistar (20 самців і 20 самиць). Середня маса тіла самців складала (129 ± 22) г, самиць – (118 ± 18) г;

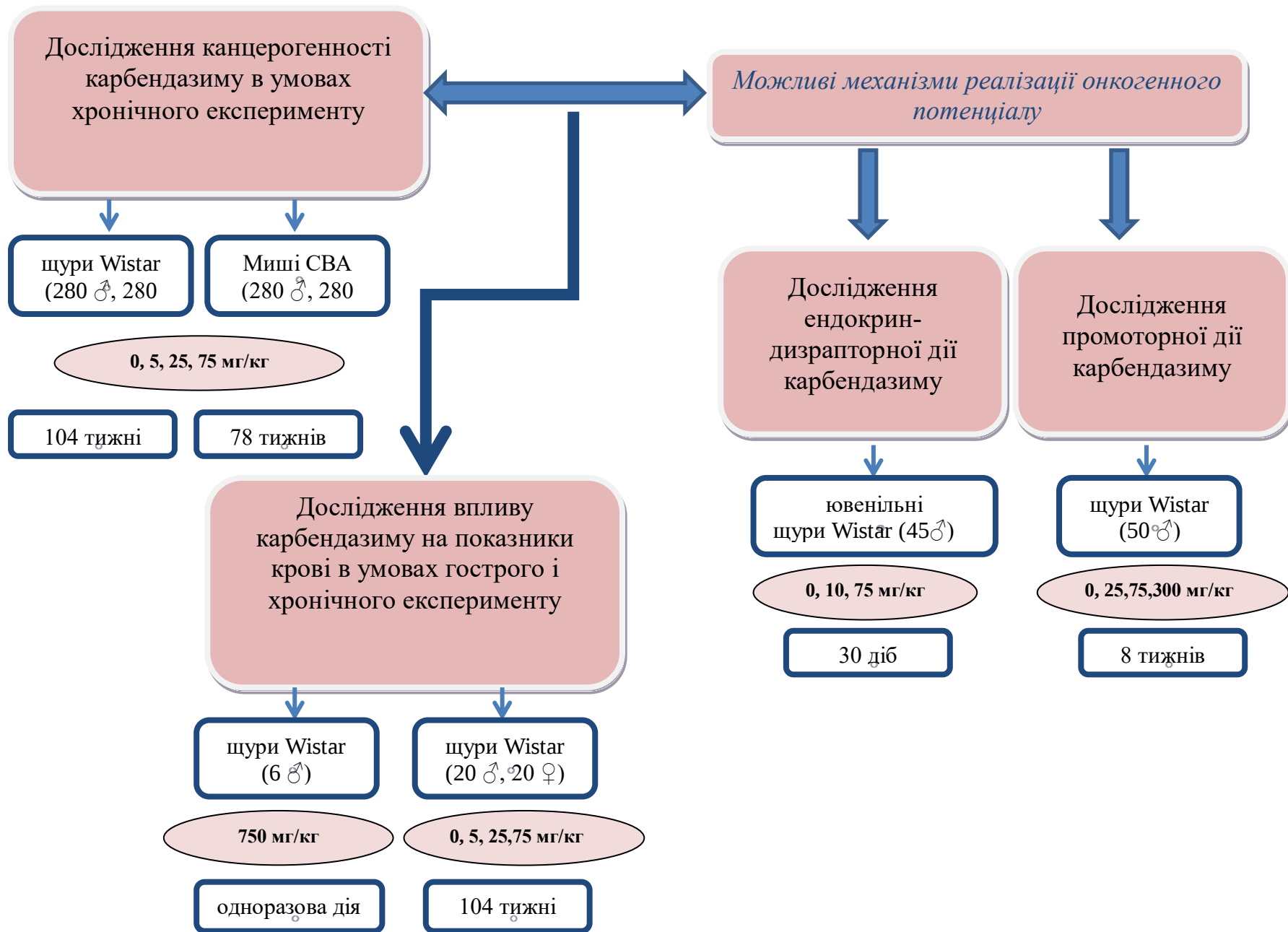


Рис. 2.1. Дизайн дослідження.

- для вивчення ендокриндизрапторної дії карбендазиму за умов середньострокової пероральної інтоксикації – 45 ювенільних щурів-самців із середньою масою тіла (40 ± 2) г;
- дослідження промоторної активності карбендазиму на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА(нітрозодietiетиламін)-гепатектомія” за умов середньострокової пероральної інтоксикації було проведене на 50 щурах-самцях із середньою масою тіла 200-250 г.

Миші лінії СВА:

- для ідентифікації канцерогенності карбендазиму за умов хронічної пероральної інтоксикації були використані 560 мишей (280 самців і 280 самиць) із середньою масою тіла самців ($21,6 \pm 2,5$) г, самиць – ($19 \pm 3,1$) г.

Щури Wistar для хронічного, гострого та середньострокового (модель “НДЕА-гепатектомія”) експериментів були отримані з розплідника дрібних лабораторних тварин ТОВ “Три-Ю”.

Ювенільні щури-самці Wistar для середньострокового дослідження з вивчення ендокриндизрапторної дії були отримані з розплідника дрібних лабораторних тварин ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України”.

Миші лінії СВА були отримані з розплідника дрібних лабораторних тварин ТОВ “Далі”.

Піддослідні тварини були вільні від специфічної патогенної мікрофлори. Впродовж експерименту вони утримувалися в стандартних умовах на збалансованому раціоні віварію. Вода – без обмежень.

Біоетичні аспекти дослідження. Усі маніпуляції з лабораторними тваринами були проведені відповідно до принципів біоетики та вимог гуманного ставлення до тварин “Європейська конвенція 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 із Законом № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009 р.). Комісією з етики медичних та біологічних досліджень ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України” не було виявлено порушень морально-етичних норм під час проведення дослідів на лабораторних тваринах (протокол № 6/2 від 02.09.2019 р.).

2.2. Умови експериментів і методи дослідження

Експериментальні дослідження були проведені на різних біологічних моделях у хронічному, коротко- і середньостроковому дослідженнях з використанням низки методів детекції змін, що виникають в органах і тканинах *in vivo*: фізіологічних, патоморфологічних, гістоморфологічних, гематологічних, цитохімічних, гістохімічних, морфометричних із застосуванням відповідних методів статистичної обробки даних. Ураховуючи, що основним шляхом надходження карбендазиму до організму є пероральний, введення речовини проводилося внутрішньошлунково.

1. Дослідження канцерогенності карбендазиму на щурах Wistar за умов хронічної інтоксикації.

Щури були розподілені на 4 групи (3 піддослідні та група негативного контролю), що склалися з 70 самців і 70 самиць у групі відповідно. Після 2-тижневої акліматизації натщесерце внутрішньошлунково за допомогою зонду тваринам вводили карбендазим у вигляді водної емульсії з емульгатором ОП-10 у дозах 5, 25, 75 мг/кг маси тіла, концентрація розчинів відповідала 0,1; 0,5 і 1,5 % відповідно. Речовина вводилася впродовж 104 тижнів 5 разів на тиждень. Розчини готували *ex tempore* на питній воді для тварин з додаванням емульгатора ОП-10. Контрольні тварини отримували

водний розчин з ОП-10 (0,05 %) за тих же умов, що й піддослідні.

Упродовж експерименту проводилися щоденний огляд і пальпація тварин для виявлення наявності підшкірних новоутворень. Зважування тварин і відповідний розрахунок введення об'єму розчину досліджуваної речовини відповідно до дози здійснювалися до 60 тижнів експерименту щотижнево, надалі (до закінчення експерименту) один раз на місяць.

Тварини, що загинули впродовж експерименту, а також після евтаназії через 52 (проміжна евтаназія, по 10 тварин з кожної експериментальної групи) та 104 тижні експерименту підлягати некропсії та макроскопічному обстеженню. При зовнішньому огляді тварин реєструвалися всі відхилення від норми, враховуючи локалізацію, розміри, рухливість і розростання в навколишні тканини поверхневих новоутворень. Для гістологічних досліджень відбиралися зразки органів і тканин з виявленими патологіями при макроскопічному вивченні, а також згідно з методичними рекомендаціями щодо дослідження канцерогенності речовин. Для встановлення діагнозу непухлинної та пухлинної патології керувалися рекомендаціями OECD і IARC [151, 158].

Показниками канцерогенного ефекту слугували: частота пухлин, коефіцієнт множинності, латентний період, ступінь малігнізації (аналіз гістоморфологічного спектра виявлених пухлин, локалізація та наявність метастазування, співвідношення доброякісних і злоякісних пухлин, фатальна смертність тварин з пухлинами).

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням загальноприйнятих методів статистики, а також рекомендованих IARC та OECD методів аналізу результатів у хронічних експериментах щодо канцерогенних властивостей речовин [150, 151, 159]. Частоту пухлин у піддослідних і контрольній групах оцінювали як за відношенням до загальної кількості тварин у групі, так і з поправкою на інтеркурентну смертність, відносно ефективного числа [160]. Проводили попарне порівняння показників кожної групи з контролем за допомогою

однобічного точного критерію Фішера або χ^2 з поправкою Йейтса. Оцінка зв'язку виявленого онкогенного ефекту з дією речовини виконувалася за допомогою тренду Пето [156, 161]. Значущість патогістологічних змін непухлинної природи в тканинах оцінювалася за допомогою точного однобічного критерію Фішера. Вживаність тварин вивчалася методом Каплан-Мейєра. Достовірність відмінностей показників оцінювали за допомогою Кокс-Мантел тесту.

2. *Дослідження канцерогенності карбендазиму на мишах лінії СВА за умов хронічної інтоксикації.*

Миші були розподілені на 4 групи (3 піддослідні та група негативного контролю), що складалися з 70 самців і 70 самиць у групі відповідно. Карбендазим вводили тваринам упродовж 78 тижнів 5 разів на тиждень внутрішньошлунково за допомогою зонду в дозах 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла у вигляді 0,1; 0,5; 1,5 % підготовленої ex tempore суспензії. Контрольні тварини отримували водний розчин з ОП-10 (0,05 %) за тих же умов, що й піддослідні.

Проведення експерименту та статистичний аналіз отриманих результатів детально викладені вище (дослідження канцерогенності на щурах). Для встановлення гістологічного діагнозу онкопатологій у мишей керувалися класифікацією пухлин лабораторних тварин, представленою в IARC Scientific Publications [162].

3. *Дослідження впливу карбендазиму на показники периферичної крові на щурах Wistar за умов гострої пероральної інтоксикації.*

Токсичність карбендазиму в умовах гострого експерименту на показники периферичної крові при пероральному надходженні до організму оцінювалася за дії 1/2 LD50 речовини. Тваринам після акліматизації натщесерце одноразово внутрішньошлунково вводили карбендазим у вигляді 50 % водної суспензії з емульгатором ОП-10 у дозі 750 мг/кг за допомогою зонду. Відбір крові здійснювали з хвостової вени тварин. Дослідження показників крові проводили в динаміці в тих самих тварин на 1-шу, 3-тю,

7-му, 14-ту та 21-шу доби після ініціації карбендазимом. В якості контролю використовували показники відібраних зразків крові тварин перед уведенням досліджуваної речовини. У периферичній крові лабораторних тварин визначали концентрацію гемоглобіну, середній вміст гемоглобіну в еритроциті (СГЕ), кількості еритроцитів, лейкоцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів. Проводили диференційований підрахунок лейкоцитів і морфологічний аналіз клітин крові на наявність атипових форм. Гематологічні дослідження здійснювали за допомогою уніфікованих клініко-лабораторних методів [163]. Оцінювали цитохімічний статус лейкоцитів, а саме активність пероксидази, хлорацетатестерази та вміст ліпідів у нейтрофілах. Вивчення активності пероксидази в нейтрофілах проводили за методом Loele; активності хлорацетатестерази в нейтрофілах за методом Moloney, McPherson, Fliegelman (1960); вмісту ліпідів у нейтрофілах за методом Askerman (1969). Активність ферментів визначали за інтенсивністю реакції за 4-бальною системою: виконували підрахунок 100 лейкоцитів певного типу та встановлювали середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) за формулою Astaldi (1957), Verga:

$$\text{СЦК} = 3a + 2b + 1v + 0г / 100 \text{ [163-165].}$$

4. *Дослідження впливу карбендазиму на показники периферичної крові на щурах Wistar за умов хронічної інтоксикації.*

До початку надходження карбендазиму в організм тварин після акліматизації були отримані вихідні дані гематологічних показників щурів, сформовані контрольна та піддослідні групи, що достовірно не відрізнялися. Тварини були розподілені на 4 групи (3 піддослідні та група негативного контролю) по 5 самців і 5 самиць відповідно. Карбендазим вводили впродовж 104 тижнів 5 разів на тиждень натщесерце за допомогою зонду в дозах 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла у вигляді водної емульсії з емульгатором ОП-10. Тварини з групи негативного контролю отримували водний розчин з емульгатором ОП-

10 в еквівалентному об'ємі. На 1-й, 3-й, 6-й, 9-й, 12-й, 18-й і 24-й місяці експерименту проводили відбір крові з хвостової вени щурів. Гематологічні дослідження здійснювали за допомогою уніфікованих клініко-лабораторних методів [163]. У периферичній крові визначали концентрацію гемоглобіну, СГЕ, кількості еритроцитів, лейкоцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів. Проводили диференційований підрахунок лейкоцитів і морфологічний аналіз клітин крові. Статистична обробка даних здійснювалася за загальноприйнятими методами [159].

5. *Дослідження ендокриндизрапторної дії карбендазиму на ювенільних щурах-самцях Wistar.*

Щури були розподілені на 3 групи (група негативного контролю та 2 піддослідні) по 15 самців у групі відповідно. Після 2-добової акліматизації натщесерце внутрішньошлунково тваринам вводили карбендазим у вигляді водної емульсії з емульгатором ОП-10 у дозі 10 і 75 мг/кг маси тіла, концентрація розчину становила 0,2 і 1,5 % відповідно. Введення проводили 1 раз на добу впродовж 30 діб (з 23-го по 53-й день від дня народження щурів – у постнатальний період (PND)) за допомогою зонду. Контрольні тварини отримували водний розчин з ОП-10 (0,05 %) за аналогічних умов. Зважування щурів і перерахунок введення об'єму розчину досліджуваної речовини відповідно до дози проводили кожні 3 дні. Контроль щодо відділення препуцію починали з 30-го дня від народження (PND 30).

Упродовж експерименту проводили клінічний огляд тварин і фіксували наступні показники: маса тіла, приріст маси тіла, відділення препуцію, маса тіла на момент статевого дозрівання (відділення препуцію), абсолютна маса органів (гіпофіз, щитоподібна залоза (з трахеєю), печінка, надниркові залози (пара), нирки (пара), сім'яники (правий, лівий), епідидиміс (правий, лівий), простата, сім'яні пухирці (з рідиною), леваторанібутьбокавернозні м'язи (LABC)), відносна маса органів (гіпофіз, щитоподібна залоза, печінка, надниркові залози, нирки), гістоморфологічні зміни в щитоподібній залозі, епідидимісах, сім'яниках. Для встановлення діагнозу керувалися

рекомендаціями OECD [167]. Статистична обробка даних проводилася за загальноприйнятими методами та вимогами методичних рекомендацій [159, 166].

6. *Дослідження промоторної дії карбендазиму на щурах Wistar за умов середньострокової пероральної інтоксикації.*

Дослідження було проведене на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія” (рис. 2.2), запропонованій N. Ito та співавт. [168].

	0	2	3	10 тижнів
1 група	↓		↓	X
2 група	↓		↓	X
3,4,5 група	↓		↓	X

Рис. 2.2. Дизайн, модель гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”.

↓—одноразова інтраперитоніальна ін’єкція нітрозодietiламіну в дозі 200 мг/г (розведення в 0,9 % розчині NaCl); ↓ — часткова гепатектомія; X — евтаназія тварин; □ — введення розчинника (негативний контроль); □ — введення розчину фенобарбіталу (доза 37,5 мг/кг маси тіла) (позитивний контроль); □ — введення карбендазиму в дозах 25 мг/кг, 75 мг/кг, 300 мг/кг маси тіла.

Щури були розподілені на 5 груп по 10 самців у групі відповідно. Всім тваринам на початку експерименту інтраперитоніально в дозі 200 мг/кг ввели НДЕА, що використовується в якості ініціатора гепатоканцерогенезу. Через два тижні після ін’єкції щурам почали вводити: розчинник (водний розчин з ОП-10 (0,05 %) – 1 група, фенобарбітал (доза 37,5 мг/кг, позитивний контроль) – 2 група і карбендазим у дозах 25, 75 і 300 мг/кг маси тіла – 3,4, 5 групи. Речовини вводили 5 разів на тиждень (6-7-й дні очікування) за допомогою зонду впродовж 8 тижнів. Через 3 тижні від початку експерименту для ініціації та проліферації гепатоцитів тваринам проводили часткову гепатектомію за методом Higgins та Anderson (1931). Гепатектомію здійснювали під неінгаляційним наркозом: перед хірургічним втручанням тваринам інтраперитоніально вводили 40 мг/кг маси тіла кетаміну та 5 мг/кг

маси тіла ксили. По закінченню експозиції карбендазимом (через 24 год), після евтаназії тварин вилучали зразок печінки і проводили гістохімічну реакцію з виявлення гамма-глутамілтрансферази (ГГТ). У зразках печінки кожної окремої тварини визначали кількість, площу і середню площу ГГТ-позитивних вузликів на умовну одиницю площі зразка печінки.

Гістотехнічна та гістохімічна обробка біологічного матеріалу. Для гістоморфологічного аналізу зразки органів і тканин фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну та заливали в парафін (Histosec 1.11609.2504, Merck, Німеччина). Зрізи (5-7 мкм) готували на ротаційному мікротомі Microm HM325 і фарбували гематоксиліном і еозином за загальноприйнятою методикою [169]. Для гістохімічного виявлення ГГТ (КФ 2.3.2.2) на мікротом-кріостаті МК-25 зі зразків печінки готували зрізи товщиною 10 мкм з подальшою фіксацією в холодному ацетоні. Для реакції використовували L-Glumatic acid (α naphthylamide) monohydrate (CAS 81012-91-1, США). Гістохімічну реакцію проводили методом азосполучення [170].

Аналіз гістологічних зразків і мазків крові здійснювали за допомогою мікроскопа (Axioskop, Німеччина), реєстрацію й обробку графічних зображень для морфометричних досліджень – Epson Perfection Scan V750 і Pro Adobe Photoshop CS6.

Обробку отриманих в експерименті даних проводили, використовуючи стандартний ліцензійний пакет програмного забезпечення Microsoft® office Excel 2010, Statistica 6.0. Застосовували параметричні та непараметричні методи статистики. Статистично достовірною вважалася різниця при $p \leq 0,05$. Евтаназію тварин здійснювали в CO₂ камері.

В експериментальних дослідженнях були задіяні 1261 тварина (701 щур і 560 мишей). У ході виконання роботи проаналізовано 20 765 показників, з них 19 040 токсикологічних та патоморфологічних в експерименті з вивчення канцерогенності; 570 гематологічних, цитохімічних, морфологічних в експерименті з вивчення впливу карбендазиму на систему крові; 855 показників ендокриндизрапторної дії та 300 - промоторної дії.

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ КАНЦЕРОГЕННОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ НА ДВОХ ВИДАХ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН (ЩУРИ ПОРОДИ WISTAR І МИШІ ЛІНІЇ СВА)

Карбендазим є одним з найпоширеніших фунгіцидів у світі, але однозначного висновку щодо його канцерогенності для людини немає. Експерти IARC це питання не розглядали, фахівці ЕРА класифікують карбендазим як можливий канцероген для людини (група С) [137], в Європейському Союзі його як канцероген не визначають [18]. Результати досліджень канцерогенності карбендазиму *in vivo*, виконаних у 1970-80-х рр., були представлені в анотованому вигляді, в офіційних документах посилання робляться на неопубліковані джерела. Тому було проведене дослідження з вивчення канцерогенності карбендазиму в хронічному експерименті на двох видах лабораторних тварин (щурі та миші).

Дослідження канцерогенності карбендазиму на щурах і мишах обох статей в умовах хронічного експерименту впродовж 104 тижнів для щурів і 78-тижневої експозиції для мишей було виконано згідно з вимогами OECD 451, рекомендаціями IARC та іншою нормативною документацією [150-156].

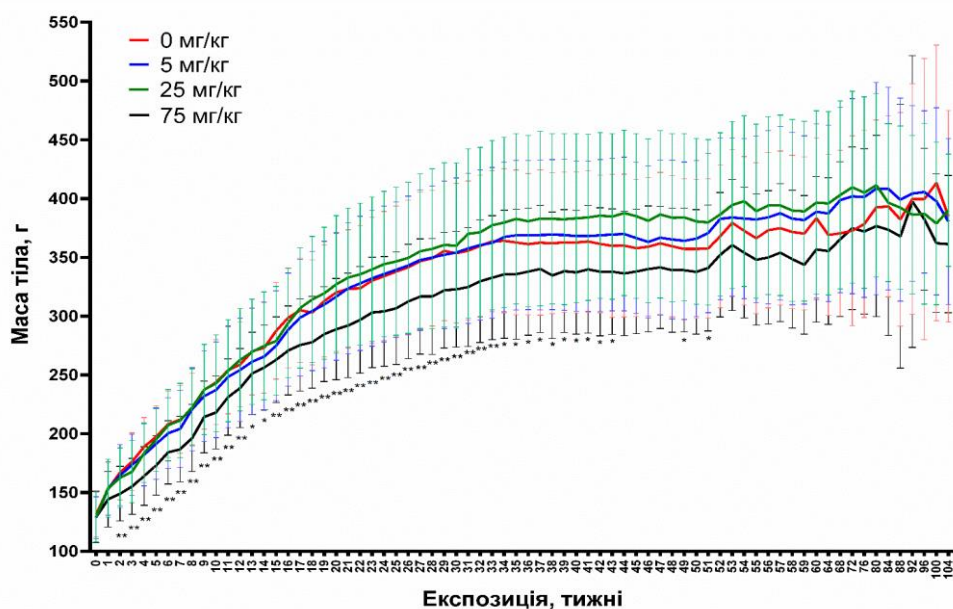
3.1. Дослідження потенційної канцерогенності карбендазиму на щурах Wistar (самці та самиці)

Експеримент був проведений на 560 щурах обох статей, порівну розподілених залежно від дози карбендазиму на 3 піддослідні групи та групу негативного контролю.

На підставі літературних даних (ВООЗ) [33] були вибрані дози 5, 25 і 125 мг/кг. Проте максимальна доза (125 мг/кг) була скорегована через

зниження приросту маси тіла самців і самиць у середньому на 28 % і 13 % відповідно впродовж перших 6-ти тижнів експерименту. У контрольних самців середній приріст маси на тварину за даний період складав 76,7 г, а у тварин, що отримували максимальну дозу карбендазиму, – 55,1 г, тобто на 28 % нижче. У контрольних самиць середній приріст маси за даний період становив 46,7 г, у тварин, що отримували максимальну дозу речовини, – 40,8 г, тобто на 13 % нижче. Оскільки при введенні максимально витривалої дози зниження приросту маси тіла тварин не повинно перевищувати 10 %, дана доза була знижена до 75 мг/кг маси тіла. В інших експериментальних групах не було встановлено суттєвих змін маси тіла.

Статистичний аналіз динаміки маси тіла щурів упродовж експерименту показав, що достовірних закономірних змін цього показника в щурів-самиць за впливу карбендазиму не відбулося. У самців, які отримували карбендазим у максимальній дозі, достовірно зниження маси тіла відмічалось до 43-го тижня експерименту ($p \leq 0,05$), на кінець експерименту маса тіла тварин даної експериментальної групи була зменшена на 6 % ($p \geq 0,05$) і відповідала (361 ± 58) г проти (385 ± 89) г у негативному контролі (рис. 3.1).



Примітка. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ порівняно з негативним контролем.

Рис. 3.1. Динаміка маси тіла щурів-самців Wistar впродовж експерименту.

Смертність тварин (самців і самиць) упродовж експерименту в контрольній групі була вищою порівняно з піддослідними. Протягом 1-го року експерименту виживаність тварин усіх експериментальних груп практично не відрізнялася. Смертність самців у піддослідних і контрольній групах була вищою, ніж самиць (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Динаміка виживаності щурів Wistar впродовж другого року хронічного експерименту з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму, %

Доза, мг/кг	Самці			Самиці		
	термін експозиції, місяці					
	12	18	24	12	18	24
0	93	55	20	97	83	42
5	93	65	28	100	93	57
25	100	75	30 [*]	100	85	58
75	93	72	32 [*]	97	87	48

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем, Кокс-Мантел тест.

Медіана виживаності самців контрольної групи становила 85 тижнів, піддослідних груп тварин залежно від дози (5, 25 і 75 мг/кг) – 88, 92 та 94 тижні. Виживаність тварин, які отримували карбендазим у дозі 25 і 75 мг/кг, була достовірно вищою, ніж у групі контролю ($p=0,01$; $p=0,007$).

Медіана виживаності самиць щурів контрольної групи становила 100 тижнів, експериментальних груп залежно від дози – 104, 104 та 103 тижні ($p \geq 0,05$). Отже, отримані показники виживаності щурів свідчать про адекватність експерименту.

Основною причиною загибелі тварин упродовж дослідження були інτερкурентні захворювання, не пов'язані з впливом речовини, оскільки мали неспецифічний характер та однакову частоту

виникнення як у піддослідних, так і контрольних тварин. При некропсії щурів за дії різних доз карбендазиму в окремих тварин були відмічені зміни розмірів тимуса, селезінки, печінки, надниркових і щитоподібної залоз, а також геморагій у тканині легень, у деяких самиць спостерігалось збільшення матки та/або яєчників, у самців – зменшення сім'яників. Вказані зміни не носили дозо-залежного характеру, крім зменшення розміру сім'яників (залежно від дози були виявлені 2/3/6 випадків, у контролі – 2).

Під час патологоанатомічного дослідження органів і тканин у частини піддослідних і контрольних щурів (самців і самиць) були встановлені гемодинамічні зміни у вигляді повнокров'я судин і локальних геморагій у легенях, нирках і печінці, в окремих тварин – повнокров'я судин селезінки, щитоподібної залози, серця та матки. Також спостерігалися дистрофічні прояви в паренхімі печінки, рідше – в нефротелії звивистих каналців нирок.

З однаковою частотою як у піддослідних, так і контрольних тварин відмічалися вікові інволютивні та дегенеративні зміни в тканині тимуса (стоншення кори та жирове заміщення) та селезінки (зменшення розмірів лімфоїдних фолікулів, потовщення сполучнотканинних балок строми). У сім'яниках щурів спостерігалися деструктивні зміни. Непухлинна патологія щурів, виявлена впродовж експерименту, наведена в дод. А (табл. А.1).

Як зазначено в отриманих даних, діагностована непухлинна патологія в експериментальних тварин суттєво не відрізнялася та не була дозозалежною, окрім змін у сім'яниках. У щурів-самців були відмічені деструктивно-атрофічні прояви (рис. 3.2), частота яких збільшувалася залежно від підвищення дози. У тварин, які отримували карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг, зміни спостерігалися в 30 % і 44 % випадків відповідно ($p \leq 0,05$).

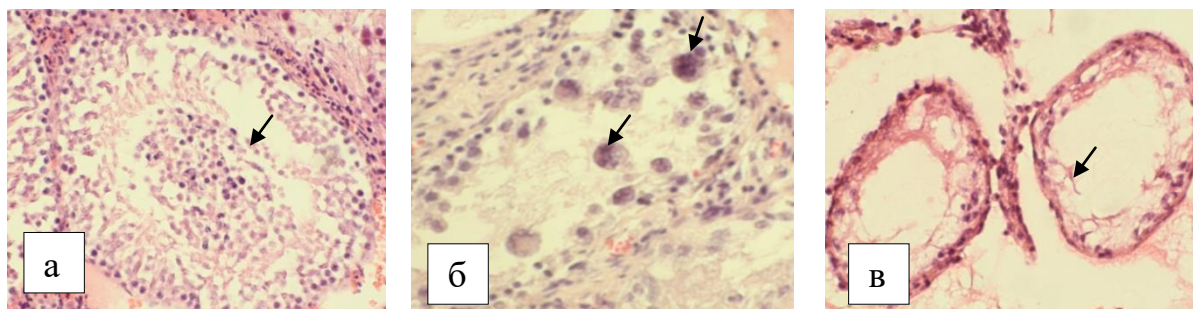


Рис. 3.2. Деструктивно-атрофічні зміни в сім'яниках щурів Wistar. Вплив карбендазиму у дозах: 75 мг/кг – десквамація клітин сперматогенного епітелію (а); 25 мг/кг – дегенеративні багатоядерні гігантські клітини в просвіті сім'яного канальця (б); 75 мг/кг – атрофія епітелію (в). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$ (а), $\times 400$ (б, в).

Проліферативні процеси та гіперплазія (рис. 3.3) спостерігалися в поодиноких випадках. Гіперплазія клітин аденогіпофізу була діагностована в самця та самиці, які отримували карбендазим у мінімальній і максимальній дозах. Фолікулярноклітинна гіперплазія щитоподібної залози відзначалася в самців, які отримували карбендазим у середній і максимальній дозах, по 1 випадку, у самиць дана патологія переважала в контрольній групі тварин. Випадок гіперплазії паращитоподібної залози був діагностований у самця за дії мінімальної дози речовини, в самиць – на рівні контролю. Випадки проліферації епітелію бронхів були виявлені як у піддослідних, так і в контрольних тварин. У самиць у контрольній групі та за дії максимальної дози карбендазиму зустрічалися прояви залозистої гіперплазії матки, самців – лейдигоклітинна гіперплазія, з тенденцією до збільшення у тварин, які отримували карбендазим у максимальній дозі 75 мг/кг.

Канцерогенність карбендазиму оцінювали відповідно до загальноприйнятих параметрів: частота пухлин, коефіцієнт множинності, латентний період, ступінь малігнізації (аналіз гістоморфологічного спектра пухлин, локалізація, метастазування, співвідношення доброякісних і злоякісних новоутворень, фатальна смертність тварин з пухлинами).

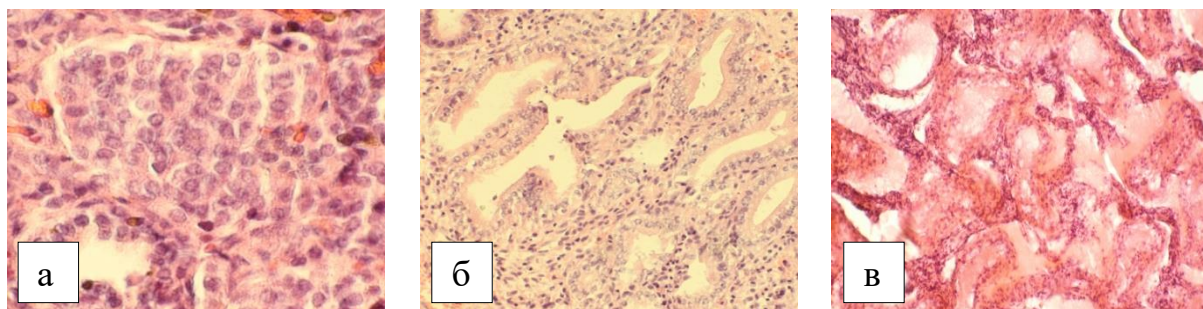


Рис. 3.3. Переднеопластичні зміни в органах і тканинах щурів Wistar. Вплив карбендазиму в дозах: 75 мг/кг – гіперплазія фолікулярних клітин щитоподібної залози (а); 5 мг/кг – атипова залозиста гіперплазія матки (б); 75 мг/кг – лейдигоклітинна гіперплазія (в). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 400$ (а), $\times 200$ (б), $\times 100$ (в).

Під час патологоанатомічного дослідження піддослідних тварин були виявлені пухлини в щитоподібній (62) та молочній (43) залозах, гіпофізі (31), сім'яниках (16), надниркових залозах (10), печінці (8), яєчниках (5), матці (4), легенях (3), мозку (1), гарднеровій залозі (1), стравоході (1), підшлунковій залозі (1), а також у гемопоетичній системі (19), м'яких тканинах (7) і шкірі (3) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Локалізація та гістоморфологічний тип пухлин, виявлених у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму, щурів Wistar

Локалізація та гістоструктура пухлин	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
ГПОФІЗ:	4 (8,1)	2 (3,6)	4 (6,8)	2 (3,7)	3 (5,1)	3 (5)	3 (5)	10 ^{*,**} (16,9)
аденома	3 (6,1)	1 (1,8)	1 (1,7)	1 (1,9)	2 (3,4)	-	2 (3,3)	8 ^{*,**} (13,5)

Локалізація та гістоструктура пухлин	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
аденокарцинома	1 (2,0)	1 (1,8)	3 (5,1)	1 (1,9)	1 (1,7)	3 (5)	1 (1,7)	2 (3,4)
ЩИТОПОДІБНА ЗАЛОЗА:	3 (6,1)	7 (12,7)	6 (10,2)	5 (9,3)	6 (10,2)	14* (23,3)	11 (18,3)	10 (16,9)
фолікулярноклі тинна аденома	2 (4,1)	4 (7,3)	4 (6,8)	2 (3,7)	3 (5,1)	10 (16,7)	6 (10)	6 (10,2)
фолікулярноклі тинна карцинома	1 (2)	3 (5,4)	2 (3,4)	3 (5,6)	3 (5,1)	4 (6,7)	5 (8,3)	4 (6,8)
МОЛОЧНА ЗАЛОЗА:	1 (2)	0	0	0	5 (8,5)	13*** (21,7)	15*** (25)	9 (15,3)
аденома	-	-	-	-	-	-	1 (1,7)	-
внутрішньопрото кова папілома	-	-	-	-	-	-	1 (1,7)	-
фіброма	-	-	-	-	-	1 (1,7)	-	2 (3,4)
фіброаденома	-	-	-	-	5 (8,5)	11 (18,3)	12 (20)	6 (10,2)
внутрішньопрото кова карцинома	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,7)
фібросаркома	1 (2)	-	-	-	-	1 (1,7)	1 (1,7)	-
ЛЕГЕНІ:	0	1 (1,8)	0	1 (1,9)	0	1 (1,7)	0	0
бронхоальвеоляр на аденома	-	-	-	1 (1,9)	-	-	-	-
аденокарцинома	-	1 (1,8)	-	-	-	1 (1,7)	-	-
ПЕЧІНКА:	0	3 (5,5)	0	1 (1,9)	2 (3,4)	0	2 (3,4)	0
холангіома	-	1 (1,8)	-	-	-	-	1 (1,7)	-

Локалізація та гістоструктура пухлин	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
гемангіома	-	-	-	1 (1,9)	-	-	-	-
гепатоцелюлярна аденома	-	1 (1,8)	-	-	2 (3,4)	-	-	-
фібросаркома	-	1 (1,8)	-	-	-	-	1 (1,7)	-
НАДНИРКОВІ ЗАЛОЗИ:	0	2 (3,6)	2 (3,4)	1 (1,9)	2 (3,4)	2 (3,3)	0	1 (1,7)
феохромцитوما	-	-	1 (1,7)	-	-	-	-	-
кортикальна аденома	-	2 (3,6)	-	1 (1,9)	-	2 (3,3)	-	1 (1,7)
гангліоневрома	-	-	-	-	1 (1,7)	-	-	-
карцинома	-	-	1 (1,7)	-	1 (1,7)	-	-	-
МАТКА:					0	1 (1,7)	3 (5)	0
аденокарцинома					-	1 (1,7)	3 (5)	-
ЯЄЧНИКИ					1 (1,7)	4 (6,7)	0	0
фіброма					-	1 (1,7)	-	-
цистаденома					-	1 (1,7)	-	-
текома					-	1 (1,7)	-	-
гранульозоклітин на пухлина					1 (1,7)	1 (1,7)	-	-
СІМ'ЯНИКИ:								
лейдигома	2 (4,1)	3 (5,5)	9* (15,3)	2 (3,7)				
ГЕМОПОЕТИЧ НА СИСТЕМА:	1 (2)	2 (3,6)	4 (6,8)	0	3 (5,1)	4 (6,7)	4 (6,7)	1 (1,7)
тімома	1 (2)	-	-	-	-	3 (5)	-	-

Локалізація та гістоструктура пухлин	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
лімфосаркома	-	-	1 (1,7)	-	1 (1,7)	1 (1,7)	2 (3,3)	1 (1,7)
ретикулосаркома	-	1 (1,8)	3 (5,1)	-	1 (1,7)	-	2 (3,3)	-
поліморфноклі тинна саркома	-	1 (1,8)	-	-	1 (1,7)	-	-	-
М'ЯКІ ТКАНИНИ:	1 (2)	2 (3,6)	0	0	0	1 (1,7)	1 (1,7)	2 (3,4)
ліпома	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	-
фіброма	1 (2)	1 (1,8)	-	-	-	1 (1,7)	-	-
гістіоцитарна саркома	-	-	-	-	-	-	1 (1,7)	1 (1,7)
недиференційова на цистсаркома	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,7)
ШКІРА	0	1 (1,8)	0	0	0	1 (1,7)	1 (1,7)	0
тріхоепітеліома	-	1 (1,8)	-	-	-	1 (1,7)	-	-
базаліома	-	-	-	-	-	-	1 (1,7)	-
ІНШЕ:	0	1 (1,8)	1 (1,7)	1 (1,9)	1 (1,7)	1 (1,7)	0	0
аденома гартнерової залози	-	-	-	-	-	1 (1,7)	-	-
карцинома підшлункової залози	-	1 (1,8)	-	-	-	-	-	-
гліома	-	-	-	-	1 (1,7)	-	-	-

Локалізація та гістоструктура пухлин	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
плоскоклітинна карцинома стравоходу	-	-	-	1 (1,9)	-	-	-	-
фібросаркома селезінки	-	-	1 (1,7)	-	-	-	-	-

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем до загальної кількості тварин; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем до ефективного числа за однобічним точним критерієм Фішера; ¹ – частота пухлин розрахована від загального ефективного числа.

Гістоморфологічний спектр виявлених пухлин у контрольній і піддослідних групах був характерним для даного виду тварин [171, 172]. Достовірне збільшення кількості пухлин було встановлене в щурів-самиць, які отримували карбендазим у дозах 5 і 25 мг/кг, порівняно з негативним контролем ($p \leq 0,05$). Між частотою злоякісних новоутворень, виявлених у піддослідних і контрольних тварин, не спостерігалось статистично достовірної різниці. Метастазуюча пухлина (аденокарцинома гіпофізу з метастазами в легенях) була діагностована лише в 1 випадку в самиці, яка отримувала карбендазим у дозі 25 мг/кг. Під час аналізу коефіцієнта множинності пухлин не було встановлено статистичних відмінностей між піддослідними та контрольною групами. Кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних (табл. 3.3).

**Кількісні показники онкогенного ефекту карбендазиму в умовах
хронічного надходження до організму щурів Wistar**

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефекти вне число	Кількість тварин з пухлинами	Частота пухлин, %	Кількість пухлин		Коефіцієнт множиннос ті пухлин
					усього	добро-/ злюжкісні пухлини	
Самці							
0	60	49	10	20,4	12	9/3	1,2
5	60	55	21	38,2	24	15/9	1,2
25	60	59	22	37,2	26	15/11	1,2
75	60	54	10	18,5	13	7/6	1,3
Самиці							
0	60	59	20	32,2	23	13/10	1,2
5	60	60	31	53,3	45*	31/14	1,4
25	60	60	31	51,6	40*	23/17	1,3
75	60	59	28	47,4	33	23/10	1,2

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем за χ^2 з поправкою Йейтса.

Згідно з отриманими результатами, найбільшу кількість (171 з 216, що становило 79 % від усіх новоутворень) складала гормонозалежні пухлини. Залежно від дози (0, 5, 25 і 75 мг/кг) у самців частота даних пухлин відповідала 10/60, 15/60, 21/60, 10/60; інших новоутворень – 2/60, 9/60, 5/60, 3/60 відповідно; в самиць – 17/60, 37/60, 32/60, 30/60 і 6/60, 8/60, 8/60, 3/60 відповідно (табл.3.2).

Був проведений уточнювальний аналіз канцерогенного ефекту серед новоутворень, що найчастіше діагностувалися в експерименті, а саме в

щитоподібній залозі, молочній залозі, гіпофізі та сім'яниках.

Щитоподібна залоза. Новоутворення щитоподібної залози являли собою папілярні, поліморфнофолікулярні, солідні аденоми, а також поліморфнофолікулярні та солідні аденокарциноми (рис. 3.5).

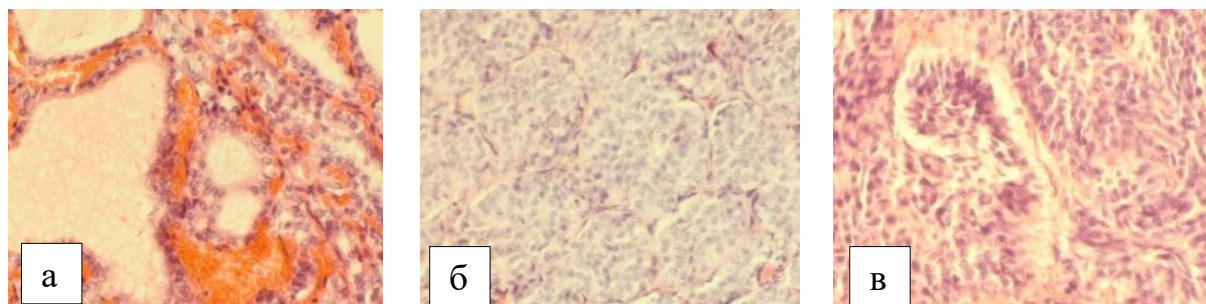


Рис. 3.5. Пухлини щитоподібної залози щурів Wistar. Вплив карбендазиму в дозах: 5 мг/кг – поліморфнофолікулярна аденома (а); 5 мг/кг – солідна аденома (б); 5 мг/кг – солідна аденокарцинома (в). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$.

Зростання частоти новоутворень щитоподібної залози у тварин спостерігалось в чіткій зворотній прогресії – чим менша доза, тим більший ефект. У самиць, які отримували карбендазим у дозі 5 мг/кг, частота пухлин була статистично достовірно збільшеною порівняно з контролем до загальної кількості тварин на групу ($p=0,042$), недостовірно збільшеною відносно ефективного числа ($p=0,096$) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Пухлин щитоподібної залози щурів Wistar у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму (самці, самиці)

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p^1	p^2
Самці						
0	60	28	3	10,7	-	-

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p ¹	p ²
5	60	31	7	22,6	0,19	0,16
25	60	37	6	16,2	0,39	0,25
75	60	38	5	13,2	0,53	0,36
Самиці						
0	60	44	6	13,6	-	-
5	60	53	14	26,4*	0,096	0,042
25	60	48	11	22,9	0,19	0,15
75	60	47	10	21,3	0,29	0,21

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем відносно загальної кількості тварин у групі; ¹ – p до ефективного числа; ² – p до загальної кількості тварин.

Достовірне збільшення частоти пухлин щитоподібної залози у самиць спостерігалось за рахунок аденом (табл.3.5). Онкогенного ефекту згідно з дозозалежним трендом Пето не встановлено: в самців $p=0,59$; самиць – $p=0,4$.

Таблиця 3.5

**Пухлини щитоподібної залози щурів Wistar у хронічному експерименті
з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму
(доброякісні, злоякісні)**

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p ¹	p ²
Аденоми						
Самці						
0	60	28	2	7,1	-	-
5	60	31	4	12,9	0,38	0,34
25	60	37	4	10,8	0,48	0,34

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p ¹	p ²
75	60	38	2	5,3	0,57	0,69
Самиці						
0	60	44	3	6,8	-	-
5	60	53	10	18,9 ^{*,**}	0,045	0,04
25	60	48	6	12,5	0,39	0,25
75	60	47	6	12,8	0,41	0,25
Карциноми						
Самці						
0	60	28	1	3,6	-	-
5	60	31	3	9,7	0,34	0,31
25	60	37	2	5,4	0,61	0,5
75	60	38	3	7,9	0,43	0,31
Самиці						
0	60	44	3	6,8	-	-
5	60	53	4	7,5	0,6	0,5
25	60	48	5	10,4	0,41	0,36
75	60	47	4	8,5	0,54	0,5

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем відносно загальної кількості тварин у групі; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем до ефективного числа за χ^2 та однобічним критерієм Фішера; ¹ – p до ефективного числа; ² – p до загальної кількості тварин.

Молочна залоза. Новоутворення молочної залози були переважно представлені фіброаденомами (рис. 3.6 а) та складали 79 % від загальної кількості пухлин даної локалізації. Інші гістологічні типи пухлин залози (як доброякісні, так і злоякісні) зустрічалися поодинокі (рис. 3.6 б-є).

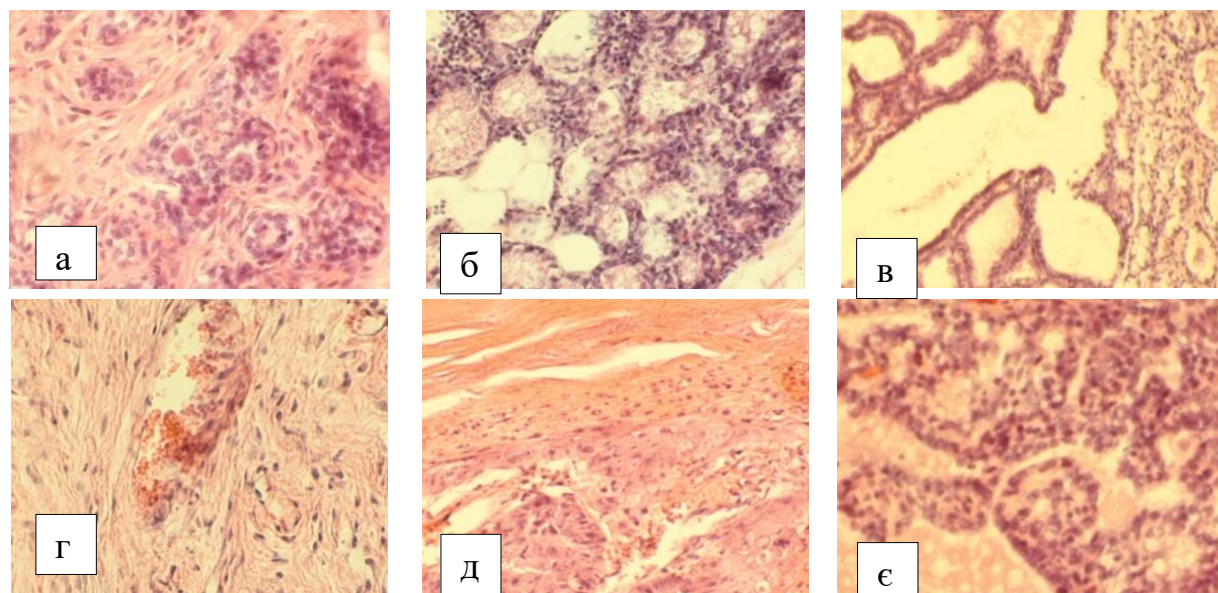


Рис. 3.6. Пухлини молочної залози щурів Wistar. Вплив карбендазиму в дозах: 5 мг/кг – фіброаденома (а); 25 мг/кг – аденома (б); 25 мг/кг – внутрішньопротокова папілома (в); 5 мг/кг – фіброма (г); 5 мг/кг – фібросаркома (д); 75 мг/кг – внутрішньопротокова карцинома (є). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$ (а, б, г-є), $\times 100$ (в).

Пухлини молочної залози переважно були виявлені при пальпації щурів у перший рік експерименту. Більшість тварин з неоплазіями піддослідних і контрольної груп дожили до термінальної евтаназії. Під час гістологічного дослідження новоутворень були діагностовані переважно фіброаденоми. Достовірне збільшення кількості пухлин було виявлене в мінімальній і середній дозах ($p \leq 0,05$). Залежність частоти пухлин молочної залози від дози карбендазиму була відсутньою (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Пухлини молочної залози щурів Wistar у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p^1	p^2
Загальна кількість пухлин молочної залози щурів-самиць						
0	60	59	5	8,5	-	-

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p ¹	p ²
Загальна кількість пухлин молочної залози щурів-самиць						
5	60	60	13	21,7 ^{*,**}	0,045	0,036
25	60	60	15	25 ^{*,**}	0,014	0,013
75	60	59	9	15,3	0,19	0,19
Фібroadеноми молочної залози						
0	60	59	5	8,5	-	-
5	60	60	11	18,3	0,09	0,09
25	60	60	12	20	0,06	0,06
75	60	59	6	10,2	0,5	0,5

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем відносно загальної кількості тварин у групі; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем щодо ефективного числа за χ^2 та однобічним точним критерієм Фішера; ¹ – p до ефективного числа; ² – p до загальної кількості тварин.

Гіпофіз. Серед виявлених в експерименті пухлин гіпофізу були діагностовані аденоми (переважно геморагічні) й аденокарциноми (рис. 3.7 а, б). Був виявлений один випадок метастазування в легені (рис. 3.7 в).

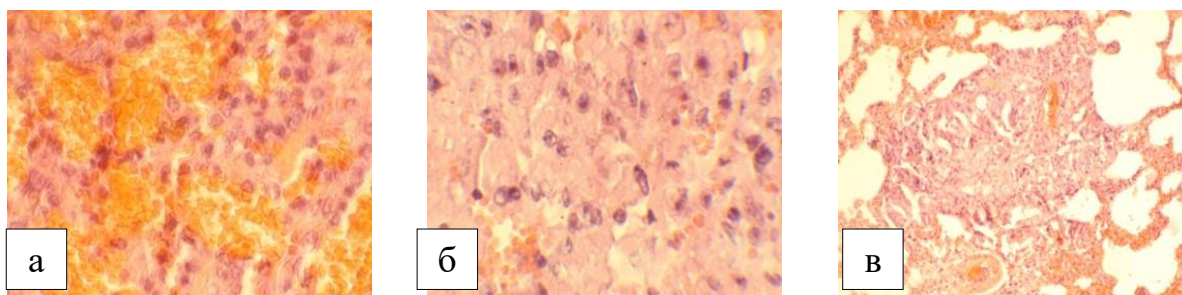


Рис. 3.7. Пухлини гіпофізу щурів Wistar. Вплив карбендазиму в дозах: 75 мг/кг – геморагічна аденома (а); 25 мг/кг – аденокарцинома гіпофізу (б) з метастазами в легені (в). Збарвлення гематоксилін та еозин; $\times 400$ (а), $\times 600$ (б), $\times 100$ (в).

Загальна кількість новоутворень гіпофізу в самців різних груп знаходилася в межах 3,7 - 8,7 %, достовірної різниці порівняно з контролем в

жодній з піддослідних груп не спостерігалось. Частота пухлин у самиць становила від 5,1 до 17,9 %. У контрольній і піддослідних групах самиць, які отримували речовину у мінімальній і середній дозах, показники практично збігалися з контрольними (5,1 % і 5,2 % проти 5,5 %), тоді як за дії максимальної дози (75 мг/кг) частота пухлин достовірно збільшувалася та складала 17,9 % (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Пухлин гіпофізу щурів Wistar у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму (самці, самиці)

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p ¹	p ²
Самці						
0	60	46	4	8,7	-	-
5	60	54	2	3,7	0,26	0,34
25	60	57	4	7	0,51	0,64
75	60	52	2	3,8	0,28	0,34
Самиці						
0	60	55	3	5,5	-	-
5	60	59	3	5,1	0,62	0,66
25	60	58	3	5,2	0,63	0,66
75	60	56	10	17,9 ^{*,**,***}	0,039	0,037

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем відносно загальної кількості тварин у групі; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем щодо ефективного числа за χ^2 та однобічним точним критерієм Фішера; *** – $p < 0,05$ відносно негативного контролю за тестом Пето (тренд); ¹ – p до ефективного числа; ² – p до загальної кількості тварин.

Достовірно збільшення частоти пухлин гіпофізу у щурів-самиць спостерігалось за рахунок аденом (табл.3.8). Тренд розвитку пухлин гіпофізу був статистично достовірним ($p=0,004$).

Пухлини гіпофізу щурів Wistar у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму (доброякісні, злоякісні)

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p ¹	p ²
Аденоми						
Самці						
0	60	46	3	6,5	-	-
5	60	54	1	1,9	0,25	0,31
25	60	57	1	1,8	0,23	0,31
75	60	52	1	1,9	0,26	0,31
Самиці						
0	60	55	2	3,6	-	-
5	60	59	0	0	0,23	0,25
25	60	58	2	3,4	0,67	0,69
75	60	56	8	14,3 ^{*,**}	0,049	0,047
Аденокарциноми						
Самці						
0	60	46	1	2,2	-	-
5	60	54	1	1,9	0,71	0,75
25	60	57	3	5,3	0,39	0,31
75	60	52	1	1,9	0,72	0,75
Самиці						
0	60	55	1	1,8	-	-
5	60	59	3	5,1	0,33	0,31
25	60	58	1	1,7	0,73	0,75
75	60	56	2	3,6	0,5	0,5

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем відносно загальної кількості тварин у групі; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем до

ефективного числа за χ^2 та однобічним точним критерієм Фішера; ¹ – р до ефективного числа; ² – р до загальної кількості тварин.

Сім'яники. Пухлини сім'яників були представлені лейдигомами (рис. 3.8), частота яких була достовірно збільшеною при попарному порівнянні з контролем за дії дози карбендазиму 25 мг/кг відносно загальної кількості тварин ($p=0,02$), щодо ефективного числа спостерігалось недостовірне зростання ($p=0,06$). Частота лейдигом щурів даної експериментальної групи становила 20 % проти 5,9 % у негативному контролі (табл. 3.9). Тренд розвитку пухлин сім'яників у діапазоні доз 0-5-25 мг/кг був позитивним ($p=0,03$).

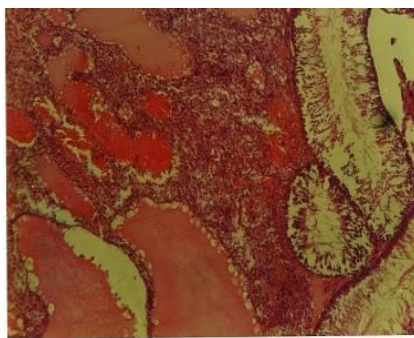


Рис. 3.8. Лейдигома. Доза карбендазиму 25 мг/кг. Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$.

Таблиця 3.9

Пухлини сім'яників щурів Wistar у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин	Частота пухлин, %	p^1	p^2
0	60	34	2	5,9	-	-
5	60	39	3	7,7	0,57	0,5
25	60	45	9	20 ^{*,**}	0,06	0,02
75	60	43	2	4,7	0,59	1,0

Примітка. ^{*} – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем відносно загальної кількості тварин у групі за χ^2 та однобічним точним критерієм Фішера; ^{**} –

$p < 0,05$ порівняно з негативним контролем за тестом Пето (тренд); ¹ – p до ефективного числа; ² – p до загальної кількості тварин.

Іншим прямим показником канцерогенного ефекту є латентний період виникнення пухлин. Аналіз даних (табл. 3.10), отриманих у хронічному експерименті на щурах, показав, що час виявлення першої пухлини був подібним у піддослідних і контрольній групах. У контрольних самців перша пухлина була встановлена через 1,5 роки експерименту (74 тижні) й являла собою аденому гіпофізу. Практично в ці ж строки перша пухлина була діагностована в групі тварин, які отримували мінімальну дозу карбендазиму (аденома печінки через 72 тижні). Приблизно на 2 місяці раніше в самця за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг була виявлена аденокарцинома гіпофізу, на 2 місяці пізніше за дії карбендазиму 75 мг/кг – аденокарцинома гіпофізу. Отже, всі “перші” пухлини в самців усіх груп як за часом появи ((18 ± 2) міс.), так і за гістоструктурою (гіпофіз, печінка) типові для спонтанного спектра пухлин щурів. Скорочення латентного періоду пухлин, а також залежності від дози речовини не спостерігалось.

У самиць час появи першої пухлини в різних групах тварин різнився більше. Проте в контрольних тварин перша пухлина була виявлена раніше за інших – через 11 місяців експерименту (315 днів), а саме фіброаденома молочної залози. На півроку пізніше за дії карбендазиму в дозі 5 мг/кг у тварин була діагностована аденома гарднерової залози. У самиць за умови впливу карбендазиму в дозі 25 мг/кг на 1,5 місяці пізніше порівняно з контролем були виявлені фіброаденома молочної залози та лімфосаркома. На 5 місяців пізніше відносно контролю була діагностована аденома гіпофізу в самиці, яка отримувала карбендазим у дозі 75 мг/кг. Усі “перші” пухлини в самиць піддослідних груп були виявлені набагато пізніше, ніж у контролі.

**Середня тривалість життя щурів Wistar і латентний період пухлин у
хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей
карбендазиму**

Доза, мг/кг	Середня тривалість життя (СТЖ) тварин, тижні		Середній латентний період пухлин				Латентний період першої пухлини, тижні
	усіх	з пухлинами	щитоподібна залоза	гіпофіз	молочна залоза	сім'яники	
Самці							
0	80,2	96,4 [*]	97	90,2	-	93	74
5	85,7	95,1 [*]	104,8	100	-	105	72
25	90,2	95,1 [*]	96,8	83	-	96,2	64
75	89,5	99,3 [*]	102,8	88	-	105	82
Самиці							
0	92,4 ^{**}	88,7	100	88,6	93	-	45
5	97,1 ^{**}	101,3	103,1	103,7	100,9	-	84
25	95,7 ^{**}	100,2	105,0	102,6	101,1	-	53
75	94,7 ^{**}	97,0	95,5	96,7	97,1	-	66

Примітка. * – $p \leq 0,05$ між СТЖ всіх щурів у експерименті та тварин з пухлинами; ** – $p \leq 0,05$ між СТЖ самиць і самців усіх щурів у експерименті за χ^2 та однобічним точним критерієм Фішера.

Також не було виявлене скорочення СТЖ щурів з пухлинами, які отримували карбендазим, порівняно з контрольними тваринами. СТЖ щурів-самців з пухлинами була більшою порівняно з величиною даного показника в самців загальної популяції. Також не було встановлене скорочення латентного періоду пухлин щитоподібної та молочної залоз, гіпофізу та

сім'яників.

Аналіз смертності тварин з пухлинами залежно від їхніх типів показав, що основна маса новоутворень була виявлена після закінчення експерименту (104 тижні), через що не встановлено статистично достовірної різниці в тривалості латентних періодів виявлених пухлин. Оцінка частоти виникнення пухлин показала, що позитивний тренд змін дози та кількості встановлених пухлин [156] у проведеному експерименті був незначущим ($Z=0,03$; $p>0,4$).

3.2. Дослідження потенційної канцерогенності карбендазиму на мишах лінії СВА (самці та самиці)

Експеримент був проведений на 560 мишах обох статей, порівню розподілених залежно від дози карбендазиму на 3 піддослідних групи та групу негативного контролю. Карбендазим досліджували в дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг.

Клінічне обстеження, що проводилося впродовж експерименту, не виявило порушень фізіологічного стану мишей експериментальних груп порівняно з тваринами контролю: не спостерігали відмінностей у поведінці, руховій активності, апетиті, диханні, стані шкіри та покривів, слизових оболонок. Маса тіла самців і самиць, які отримували речовину у різних дозах, не знижувалася як при порівнянні піддослідних груп між собою, так і відносно контрольних тварин.

Виживаність піддослідних тварин упродовж експерименту достовірно не відрізнялася від контрольних мишей. Водночас у самців, які отримували речовину у низькій і середній дозах, смертність у другій половині експерименту (10-14 міс.) була дещо вищою, ніж у контрольних тварин і тих, які одержували максимальну дозу речовини, а наприкінці експерименту – достовірно збільшеною ($p\leq 0,05$). У самиць приблизно в ті ж терміни зростала смертність при введенні високої дози (табл. 3.11).

Медіана виживаності самців контрольної групи становила 73 тижні, піддослідних груп тварин залежно від дози (5, 25 і 75 мг/кг) – 59, 67 і 71 тижень.

Виживаність тварин, які отримували карбендазим у дозах 5 і 25 мг/кг, була достовірно зниженою порівняно з контролем ($p=0,010$; $p=0,011$).

Таблиця 3.11

**Динаміка виживаності мишей лінії СВА упродовж другого року
хронічного експерименту з вивчення онкогенних властивостей
карбендазиму, %**

Доза карбендазиму, мг/кг	Самці			Самиці		
	термін дії, міс.					
	12	15	18	12	15	18
0	80	65	45	90	83	66
5	55	48	23 [*]	91	83	55
25	62	55	22 [*]	90	83	56
75	77	63	32	74	62	45 [*]

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем, Кокс-Мантел тест.

Медіана виживаності самиць-мишей контрольної групи становила 78 тижнів, експериментальних груп залежно від дози – 78, 78 і 71 тиждень. Виживаність тварин, які отримували карбендазим у дозі 75 мг/кг, була достовірно зниженою порівняно з контролем ($p=0,08$).

Отже, тривалість життя тварин у проведеному експерименті, згідно з вимогами OECD 116, дозволяє зробити адекватні висновки щодо канцерогенності досліджуваного зразка карбендазиму.

СТЖ в самців, які отримували низьку та середню дози, була меншою на 13,8 % і 12,5 % ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з контролем. У самиць зменшення СТЖ на 14,9 % ($p \leq 0,05$) спостерігалось лише в групі високої дози.

Основною причиною загибелі тварин упродовж досліджень були інтеркурентні захворювання, що мали неспецифічний характер і зустрічалися приблизно з однаковою частотою в піддослідних і контрольних тварин. Переважно це були запальні процеси (пневмонії, поодинокі абсцеси в різних органах), порушення обміну речовин (системний амілоїдоз, диспротеїнози

різних ступенів вираженості, кальцієві петрифікати), а також характерні для мишей полікістозні переродження кори нирок, пов'язані з віком, застійні кісти в органах статеві системи.

У поодиноких випадках у мишей виявлялися гіперплазії, що розглядалися як передпухлинні стани: в печінці – осередкові гіперплазії гепатоцитів (самці, дози 5 і 25 мг/кг, по 1 випадку в групі), гіперплазія ендотелію судин (самець, доза 25 мг/кг), у сечовому міхурі – папіломатозні вирости уротелію (самець, доза 5 мг/кг), утворення гнізд Брунна (самець, доза 75 мг/кг). Були зареєстровані випадки папілярної гіперплазії епітелію в сім'яних пухирцях (1 випадок, доза 5 мг/кг) і залозистої гіперплазії матки (по 1 випадку за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг і в контрольній групі) (дод. А, табл. А.2). Оскільки гіперплазії були поодинокими та зустрічалися у тварин піддослідних і контрольної груп, можна вважати, що передпухлинні стани носили випадковий характер і не були пов'язані з впливом карбендазиму.

Після евтаназії та під час патологоанатомічного дослідження тканин загиблених тварин були виявлені пухлини з локалізацією в печінці (15), легенях (8), молочній залозі (5), матці (3), яєчниках (3), гемопоетичній системі (3) (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Локалізація та гістологічний тип пухлин, виявлених у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму, мишей лінії СВА

Локалізація та гістологічний тип пухлини	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
МОЛОЧНА ЗАЛОЗА	0	0	0	0	1 (1,9)	1 (1,8)	2 (3,8)	1 (2,7)

Продовження табл. 3.12

Локалізація та гістологічний тип пухлини	Кількість і частота пухлин ¹ , %							
	самці, доза карбендазиму, мг/кг				самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
	0	5	25	75	0	5	25	75
Аденокарцинома	-	-	-	-	-	1 (1,8)	2 (3,8)	1 (2,7)
Саркома	-	-	-	-	1 (1,9)	-	-	-
ЛЕГЕНІ	0	3 (7)	2 (4,4)	0	0	1 (1,8)	2 (3,8)	0
Аденома	-	1 (2,3)	1 (2,2)	-	-	1 (1,8)	1 (1,9)	-
Аденокарцинома	-	2 (4,7)	1 (2,2)	-	-	-	1 (1,9)	-
ПЕЧІНКА	2 (3,6)	1 (2,3)	4 (8,8)	4 (13,3)	2 (3,9)	1 (1,8)	1 (1,9)	0
Аденома	2 (3,6)	1 (2,3)	3 (6,6)	3 (10)	2 (3,9)	-	1 (1,9)	-
Аденокарцинома	-	-	1 (2,2)	1 (3,3)	-	1 (1,8)	-	-
МАТКА	-	-	-	-	1 (1,9)	1 (1,8)	1 (1,9)	0
Аденома	-	-	-	-	-	0	1(1,9)	-
Аденокарцинома	-	-	-	-	-	1(1,8)	-	-
Саркома	-	-	-	-	1 (1,9)	0	-	0
ЯЄЧНИКИ	-	-	-	-	3 (5,8)	0	0	0
Текома	-	-	-	-	1 (1,9)	-	-	0
Гранульозоклітинна пухлина	-	-	-	-	2 (3,9)	-	-	0
ГЕМОПОЕТИЧНА СИСТЕМА	1 (1,8)	0	0	0	1 (1,9)	0	0	1 (1,9)
Лімфосаркома	1 (1,8)	-	-	-	1 (1,9)	-	-	1 (1,9)

Примітка. ¹ – частота пухлин (%) розрахована від ефективного числа.

Гістоморфологічний спектр новоутворень мишей був характерним для даної лінії тварин [174, 175]. Серед пухлин печінки та легень були виявлені аденоми й аденокарциноми; молочної залози – аденокарциноми, саркоми;

матки – аденоми, аденокарциноми, саркоми. В яєчниках відмічалися гранульозоклітинні пухлини та текома, гемопоетичній системі – лімфосаркоми. Переважна більшість пухлин була діагностована в печінці та легенях мишей-самців (рис. 3.9).

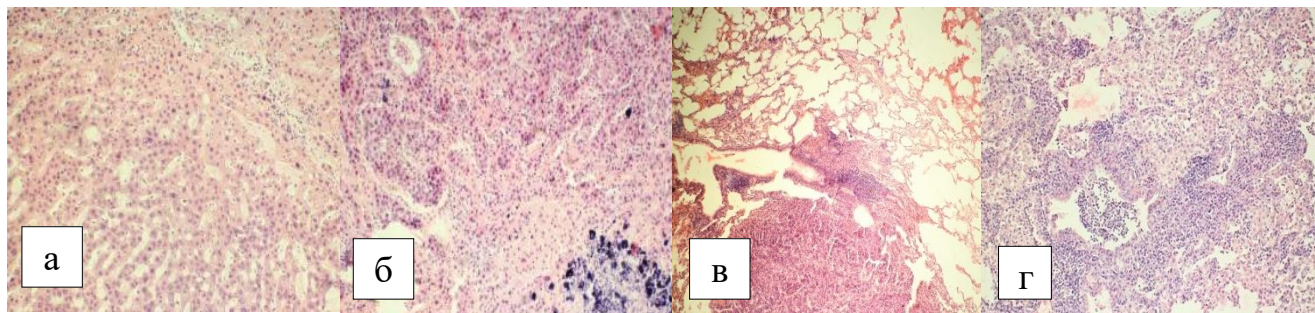


Рис. 3.9. Пухлини мишей лінії СВА, виявлені в експерименті. Вплив карбендазиму в дозах: 25 мг/кг – гепатоцелюлярна аденома (а); 75 мг/кг – аденокарцинома печінки (б); 25 мг/кг – аденома легень (в); 5 мг/кг – аденокарцинома легень (г). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 200$.

Безпосереднім критерієм оцінки канцерогенного ефекту в експериментальних дослідженнях була частота пухлин. Під час статистичного аналізу не було виявлене збільшення загальної частоти пухлин у мишей обох статей у піддослідних групах порівняно з контролем.

Загалом частота встановлення пухлин у піддослідних і контрольній групах з урахуванням інтеркурентної смертності тварин відповідала онкологічній характеристиці мишей лінії СВА. Найбільш помітні відмінності між групами відзначилися щодо частоти пухлин легень самців у мінімальній дозі порівняно з контролем. Проте більш детальний аналіз із застосуванням точного однобічного критерію Фішера не виявив статистичної різниці за даним показником ($p=0,0921$).

Між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин, також не було встановлено статистично значущої різниці. Метастатичні пухлини в даному експерименті не спостерігалися. У самців кількість доброякісних пухлин переважала над злоякісними. У самиць, навпаки, злоякісних пухлин було виявлено більше, ніж доброякісних.

У контрольній групі їхнє співвідношення (доброякісні/злякісні) становило 0,6, у піддослідних групах, що отримували дози карбендазиму 5 і 25 мг/кг – 1,0 і 1,0 відповідно. За дії максимальної дози 75 мг/кг були виявлені 2 злякісні новоутворення різної локалізації за відсутності доброякісних (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

**Кількісні показники онкогенного ефекту карбендазиму в умовах
хронічного надходження в організм мишей лінії СВА**

Доза, мг/кг	Кількість тварин	Ефективне число	Кількість пухлин		
			усього	добро/злаякіс ні пухлини	частота пухлин, %
Самці					
0	60	55	3	2/1	5,5
5	60	43	4	2/2	9,3
25	60	45	6	4/2	13,3
75	60	30	4	3/1	13,3
Самиці					
0	60	52	8	3/5	15,3
5	60	56	4	2/2	7,1
25	60	53	6	3/3	11,3
75	60	36	2	0/2	5,5

Оцінку латентного періоду появи пухлин проводили на підставі клінічних спостережень і результатів гістологічних досліджень тварин, евтаназія яких відбулася через 52 тижні від початку експерименту. У результаті були виявлені кілька новоутворень молочної залози в самиць, терміни їх виявлення у контрольній і досліджуваних групах статистично не відрізнялися.

У тварин, які отримували карбендазим, не спостерігалось передпухлинних

станів, що б свідчили про канцерогенез у конкретному органі чи тканині, зростали за кількістю в подальші терміни експерименту або могли бути використані для визначення латентного періоду відповідних пухлин.

Час виявлення першої пухлини в самців контрольної групи був значно меншим, ніж у мишей піддослідних груп. У контрольних самців 1-ша пухлина була встановлена в загиблої тварини через 196 діб експерименту (28 тижнів) і являла собою аденому печінки. Серед тварин піддослідних груп перша пухлина (аденома легені) була виявлена на 281-шу добу (41 тиждень) у самця в дозі 5 мг/кг; на 298-му добу (43 тижні) була встановлена аденома печінки в самця в дозі 25 мг/кг; на 480-ту добу (69 тижнів) – аденокарцинома печінки в дозі 75 мг/кг.

У самиць 1-ша пухлина (аденокарцинома молочної залози) спостерігалася в загиблої тварини через 307 діб експерименту (44 тижні) в дозі 5 мг/кг. У контрольній групі 1-ша пухлина (аденома печінки) була виявлена в близькі терміни – на 353-ту добу (51 тиждень). В інших піддослідних групах (5 і 25 мг/кг) перші пухлини були визначені пізніше – на 406-ту (58 тижнів; аденома печінки) та 455-ту (65 тижнів; лімфосаркома) доби відповідно.

Отже, першими пухлинами зазвичай були новоутворення печінки. Скорочення їхнього латентного періоду не спостерігалось, оскільки всі вони утворилися у тварин піддослідних груп пізніше, ніж у контрольній.

Тривалість середнього латентного періоду пухлин у самців, які отримували карбендазим, була більшою, ніж у контрольних тварин ($p \leq 0,05$). У самиць, які одержували карбендазим, і контрольних тварин середня тривалість латентного періоду суттєво не відрізнялася. Не було виявлене скорочення СТЖ мишей з пухлинами, які отримували карбендазим, порівняно з контрольними тваринами. Навпаки, СТЖ самців з пухлинами була більшою порівняно з величиною цього показника в самців загальної популяції. У самиць у дозах 5 і 25 мг/кг різниці в СТЖ у тварин з пухлинами та мишей загальної популяції не спостерігалось. Лише в дозі 75 мг/кг було

виявлене статистично значуще ($p \leq 0,05$) зростання СТЖ в мишей з пухлинами порівняно з усіма тваринами в групі. Аналіз з поправкою на інтеркурентну смертність не встановив статистично значущого скорочення тривалості середнього латентного періоду пухлин печінки та легень у піддослідних тварин порівняно з контролем. Решта пухлин виявлялися в поодиноких випадках (табл. 3.14). Аналіз смертності тварин з пухлинами показав, що переважна більшість останніх була виявлена під час термінальної евтаназії.

Таблиця 3.14

Середня тривалість життя мишей лінії СВА та латентний період пухлин, виявлених у хронічному експерименті з вивчення онкогенних властивостей карбендазиму

Доза, мг/кг	СТЖ, тижні		Середній латентний період виникнення пухлин, тижні				
	усіх	з пухлинами	печінки	легень	гемопое- тич ної системи	матки	молочної залози
Самці							
0	64	49,0 [*]	41,5 (2)	-	64 (1)	-	-
5	56,4 ^{**}	69,5 [*]	79 (1)	66,3 (3)	-	-	-
25	56,9 ^{**}	70,3 [*]	68,6 (4)	79 (2)	-	-	-
75	63,6	75,0 [*]	75 (4)	-	-	-	-
Самиці							
0	71	68,4	65 (2)	-	59 (1)	66 (1)	65 (1)
5	69,4	64,2	79 (1)	69 (1)	-	65 (1)	44 (1)
25	69,9	68,6	58 (1)	79 (2)	-	79 (1)	63,5 (2)
75	61,9 ^{**}	74,3	-	-	65 (1)	-	79 (1)

Примітка. ^{*} – $p \leq 0,05$ між середньою тривалістю життя всіх мишей в експерименті та тварин з пухлинами; ^{**} – $p \leq 0,05$ між середньою тривалістю життя мишей в експерименті та контролі за χ^2 та однобічним точним критерієм Фішера.

Висновки до розділу 3

1. За умов хронічного перорального надходження карбендазиму до організму самців і самиць щурів Wistar упродовж 104 тижнів загибелі тварин, пов'язаної з дією речовини, не встановлено. Відмінностей гістоморфологічного спектра виявлених пухлин у тварин, які отримували карбендазим, не зазначено. Не виявлено новоутворень, що не характерні для щурів Wistar. Під час кількісної оцінки спектра пухлин у всіх піддослідних групах встановлене збільшення частоти гормонозалежних пухлин. У щурів-самиць виявлене достовірне зростання частоти пухлин щитоподібної залози в дозі 5 мг/кг, молочної залози – 5 мг/кг і 25 мг/кг, гіпофізу – 75 мг/кг; у самців збільшення частоти лейдигоклітинних пухлин діагностоване в дозі 25 мг/кг. Встановлена відсутність статистично достовірної різниці між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин ($p > 0,05$). Метастазуюча пухлина (аденокарцинома гіпофізу з метастазами в легені) виявлена в 1 випадку в самиці за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг. Коефіцієнт множинності статистично не відрізнявся в піддослідних і контрольній групах. Кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних. Показано, що час виявлення першої пухлини та середнього латентного періоду розвитку пухлини співставний у піддослідних і контрольній групах. СТЖ всіх тварин і тварин з пухлинами, які отримували карбендазим, не відрізнялася від контрольних. Показана відсутність залежності від дози карбендазиму загальної частоти пухлин у піддослідних тварин. Переважна більшість пухлин виявлена як у самців ($p \geq 0,05$), так і в самиць ($p \leq 0,05$) у дозах 5 і 25 мг/кг. Під час аналізу непухлинної патології показано, що карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг спричиняє деструктивні зміни в сім'яниках, що призводять до атрофії, а також лейдигоклітинної гіперплазії. Виявлені гемодинамічні та деструктивно-дистрофічні зміни в паренхіматозних органах як вікового, так і компенсаторно-адаптаційного характеру не пов'язані з уведенням карбендазиму та не виходять за межі фізіологічних коливань контрольних тварин.

2. За умов хронічного перорального надходження карбендазиму до організму самців і самиць мишей лінії СВА упродовж 78 тижнів загибелі тварин, що пов'язана з дією речовини, не встановлено. Якісних відмінностей гістоморфологічного спектра виявлених пухлин у тварин, які отримували карбендазим, не встановлено. Не виявлено новоутворень, що не характерні для мишей лінії СВА. Метастатичні та множинні пухлини в даному експерименті не спостерігалися. У самців кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних, у самиць було виявлено більше злоякісних пухлин, ніж доброякісних. Показано, що час виявлення першої пухлини та середнього латентного періоду розвитку пухлини співставний у піддослідних і контрольній групах. СТЖ всіх тварин і тварин з пухлинами, які отримували карбендазим, не відрізнялася від контрольних. Відмічена відсутність залежності від дози карбендазиму загальної частоти пухлин у піддослідних тварин. Під час аналізу непухлинної патології зазначено, що виявлені гемодинамічні та деструктивно-дистрофічні зміни в паренхіматозних органах як вікового, так і компенсаторно-адаптаційного характеру не пов'язані з введенням карбендазиму та не виходять за межі фізіологічних коливань контрольних тварин. Діагностовані передпухлинні стани (гіперплазії) носили випадковий характер і не були пов'язані з впливом карбендазиму.

Основні результати даного розділу висвітлено в наступних публікаціях:

1. 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.
2. 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.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ КАРБЕНДАЗИМУ НА СИСТЕМУ КРОВІ ЩУРІВ WISTAR

Основним механізмом токсичної дії карбендазиму є цито- та генотоксичні (анеугенні) ефекти [132, 133], спричинені порушенням утворення веретена поділу при мітозі. Вони можуть мати вплив на процеси кровотворення за рахунок порушення мітотичної активності клітин-попередників у кістковому мозку, а також на імунний статус організму. У зв'язку з цим важливим є з'ясування характеру змін у периферичній крові щурів за умов гострої та хронічної інтоксикації.

4.1. Дослідження впливу карбендазиму на показники периферичної крові щурів-самців Wistar за умов гострої пероральної інтоксикації

Вивчення впливу гострої пероральної токсичності карбендазиму на показники периферичної крові було проведене на щурах-самцях Wistar. Карбендазим вводили в дозі 750 мг/кг у вигляді 50 % водної суспензії.

За дії досліджуваної речовини в периферичній крові щурів-самців на 1-шу та 3-тю доби експерименту було відмічене достовірне зменшення кількості ретикулоцитів на 49 % і 51 % відповідно. На 7-му добу почалося відновлення цих клітин, 21-шу – достовірне збільшення (на 75 %; $p \leq 0,05$). Кількість еритроцитів зменшилася (на 18 %; $p \leq 0,05$) на 14-ту добу експерименту. На 21-шу добу знизився рівень гемоглобіну в крові (на 10 %; $p \leq 0,05$), водночас СГЕ залишився на рівні контрольних показників. На кінець дослідження (21-ша доба) кількість тромбоцитів достовірно знизилася на 31 % (табл. 4.1).

Упродовж експерименту в мазках крові спостерігали морфологічно змінені еритроцити (акантоцити), найбільша кількість яких (до 67 %) була виявлена на 1-шу добу (рис. 4.1 а). Поліхроматофілія еритроцитів відмічалася з 7-ї по 14-ту доби включно (рис. 4.1 б).

**Гематологічні показники щурів-самців Wistar за умов гострої
інтоксикації карбендазимом**

Показники	Термін дослідження, доба					
	контроль	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Ретикулоцити, ‰	3,0±0,4	1,53±0,1*	1,48±0,1*	2,08±0,5	5,15±0,9	5,25±0,9*
Еритроцити, Г/л	6,91±0,3	7,39±0,2	6,98±0,4	6,38±0,5	5,64±0,5*	5,87±0,4
Гемоглобін, ммоль/л	9,88±0,2	9,39±0,4	9,53±0,5	9,55±0,2	9,71±0,5	8,94±0,3*
СГЕ, фмоль	1,48±0,1	1,27±0,1	1,38±0,1	1,53±0,1	1,78±0,1	1,55±0,1
Тромбоцити, Г/л	839±47	758±96	651±103	855±116	661±74	580±45*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем.

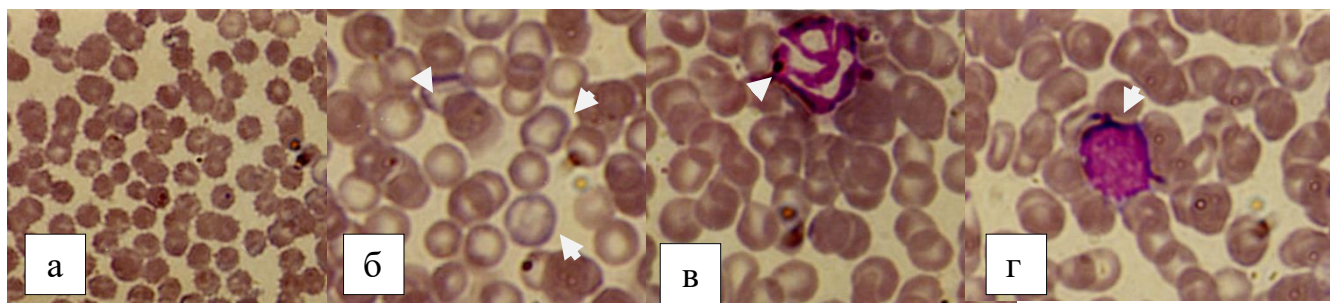


Рис. 4.1. Морфологічні та морфо-функціональні зміни в еритроцитах і лейкоцитах щурів Wistar за дії карбендазиму в дозі 750 мг/кг. Забарвлення за Паппенгеймом-Крюковим, $\times 1000$. Акантоцитоз еритроцитів, 1-ша доба експерименту (а); поліхроматофілія еритроцитів, 7-ма доба експерименту (б); гіперсегментація ядра нейтрофіла, 3-тя доба (в); атипові лімфоцити, 3-тя доба (г).

За результатами лейкограми (табл. 4.2) на 3-тю та 7-му доби експерименту загальна кількість лейкоцитів достовірно знизилася на 27 % ($p \leq 0,05$) і 28 % ($p \geq 0,05$) відповідно. Під час аналізу гранулоцитів (3-тя доба) було виявлене достовірне зменшення кількості паличкоядерних нейтрофілів на 72 % ($p \leq 0,05$), сегментоядерних нейтрофілів на 65 % ($p \leq 0,05$), загальної кількості нейтрофілів на 66 % ($p \leq 0,05$) відповідно. На 7-му добу кількість нейтрофілів почала відновлюватися, на 21-шу – достовірно збільшилася (на 59 %; $p \leq 0,05$). Крім цього, на 3-тю та 7-му доби спостерігалось недостовірне зростання кількості моноцитів (на 23 % та 53 % відповідно), на 21-шу добу вона збільшилася на 57 % ($p \geq 0,05$). Зростання кількості лімфоцитів також було відмічене на 3-тю та 7-му доби експерименту (на 16 % і 9 % відповідно), на 21-шу добу спостерігалось їхнє зменшення (на 23 %; $p \leq 0,05$).

Таблиця 4.2

**Лейкограма та вміст лейкоцитів периферичної крові щурів-самців
Wistar за умов гострої інтоксикації карбендазимом**

Показники	Термін дослідження, доба					
	контроль	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Лейкоцити, Г/л	14,8±1,2	13,5±1,3	10,8±1,1*	10,62±2,6	14,13±2,5	14,75±1,3
Нейтрофільні метамієлоцити, %	0	0,33±0,2	0	0	0,33±0,4	0,17±0,2
Нейтрофіли паличкоядерні, %	1,8±0,5	2,8±1,1	0,5±0,4*	2,0±0,5	4,67±1,4	5,50±0,8*
Нейтрофіли сегментоядерні, %	17,6±2,1	21,8±3,4	6,1±1,4*	9,17±2,1*	16,67±2,8	25,33±4,1
Усього нейтрофілів, %	19,5±1,8	25,0±3,8	6,7±1,6*	11,2±2,3*	21,7±3,1	31,0±3,5*
Еозинофіли, %	1,3±0,7	2,0±0,7	2,0±0,8	0,2±0,1	1,0±0,4	2,3±1,1
Базофіли, %	0	0,17±0,2	0	0	0,17±0,2	0

Продовження табл. 4.2

Показники	Термін дослідження, доба					
	контроль	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Моноцити, %	6,7±1,2	7,0±1,6	8,2±1,2	10,2±2,5	5,3±1,1	10,5±1,4
Лімфоцити, %	72,0±2,3	66,0±3,4	83,1±2,8	78,5±2,7	71,83±3,5	56,17±4,4*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем.

Під час цитоморфологічного аналізу клітин білої крові на 1-шу добу експерименту було встановлене незначне збільшення кількості нейтрофілів з гіперсегментованими ядрами, зруйнованих нейтрофілів, клітин лейколізу, атипових лімфоцитів. Тенденція до зростання чисельності морфологічно змінених лейкоцитів тривала до 14-ї доби, в цей період кількість зазначених клітин відносно контрольних показників була достовірно збільшеною. Наприкінці експерименту кількість морфологічно змінених клітин білої крові була наближеною до контрольних показників (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Морфологічний аналіз лейкоцитів щурів-самців Wistar за умов гострої інтоксикації карбендазимом, кількість на 100 клітин

Цитоморфологічні показники, %	Термін дослідження, доба					
	контроль	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Нейтрофіли з гіперсегментованим ядром	1,33±0,5	1,50±0,2	2,33±0,5	2,33±0,7	3,0±0,4*	1,88±0,4
Лейколіз нейтрофілів	1,33±0,5	1,5±0,4	2,0±0,5	2,3±0,5	4,16±0,6*	2,0±0,5
Атипові лімфоцити	1,83±0,2	2,17±0,7	2,33±0,5	2,66±0,5	3,0±0,4*	2,50±0,5

Продовження табл. 4.3

Цитоморфологічні показники, %	Термін дослідження, доба					
	контроль	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Клітини лейколізу	2,16±0,5	4,16±1,2	4,33±0,6*	5,5±1,1*	5,0±0,4*	3,16±0,4

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем.

Зміни цитохімічних показників у лейкоцитах почалися з 3-ї доби експерименту (табл. 4.4) – у нейтрофілах вміст ліпідів знизився на 21 % ($p \leq 0,05$). На 7-му добу достовірно зменшилася активність пероксидази та хлорацетатестерази (на 34 % та 25 % відповідно). Наприкінці експерименту активність ферментів і вміст ліпідів у лейкоцитах мали тенденцію до відновлення.

Таблиця 4.4

**Цитохімічні показники активності внутрішньоклітинних ферментів
лейкоцитів щурів-самців Wistar за умов гострої інтоксикації
карбендазимом**

СЦК	Термін дослідження, доба					
	контроль	1-ша	3-тя	7-ма	14-та	21-ша
Пероксидаза в нейтрофілах	2,02±0,1	1,88±0,1	1,82±0,2	1,34±0,2*	1,49±0,1*	1,87±0,1
Хлорацетатестераза в нейтрофілах	1,26±0,1	1,05±0,1	1,34±0,1	0,95±0,04*	1,33±0,1	1,20±0,1
Ліпіди в нейтрофілах	1,61±0,1	1,76±0,1	1,27±0,1*	1,25±0,2	1,4±0,2	1,35±0,2

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем.

Отже, за результатами проведеного дослідження було встановлено, що карбендазим при одноразовому пероральному надходженні до організму щурів-самців у дозі 750 мг/кг насамперед призводив до зменшення кількості клітин еритроїдного ряду, а саме ретикулоцитів (1-3-тя доба), з подальшим зниженням еритроцитів (14-21-ша доба). Ймовірною причиною такого ефекту була доведена цитотоксична дія карбендазиму, що може реалізовуватися не лише на фітопатогенних грибах, але й на інших клітинах з високим мітотичним індексом, зокрема еритроїдних клітинах кісткового мозку [132, 133].

Упродовж експерименту, незважаючи на відповідні відновні та регенеративні процеси, а саме ретикулоцитоз і поліхроматофілію еритроцитів, що є показниками регенерації клітин еритроїдного ряду в кістковому мозку, кількість еритроцитів і рівень гемоглобіну у тварин залишилися достовірно зниженими, що свідчило про анемізуючу дію карбендазиму. А незмінений середній вміст гемоглобіну в еритроциті був ознакою нормохромної анемії.

Виявлене збільшення кількості морфологічно змінених еритроцитів (акантоцитів) було одним з показників анемії, обумовленим зміною структури та функції мембран еритроцитів, а також опосередкованої гепатотоксичної дії [177-179].

Встановлена в експерименті лейкоцито- та нейтрофілоцитопенія (3-7-ма доба) за рахунок зменшення кількості паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів може бути пов'язаною з токсичною дією карбендазиму на гранулоцитопоез. Надалі чисельність нейтрофілів почала зростати (7-14-та доба) та наприкінці експерименту (21-ша доба) достовірно збільшилася відносно контролю, що вказувало на компенсаторну реакцію системи крові. Одночасно (21-ша доба) відмічалася відповідне достовірне зниження кількості лімфоцитів.

Збільшення чисельності моноцитів, що корелювало з підвищенням кількості клітин лейколізу, може розглядатися як мобілізація механізмів

неспецифічної адаптації.

За впливу карбендазиму також виявлено підвищення кількості нейтрофілів з гіперсегментованим ядром, зруйнованих нейтрофілів, атипових лімфоцитів, клітин лейколізу. Не виключено, що збільшення в судинному руслі кількості морфологічно змінених лейкоцитів може бути пов'язано з токсикогенним навантаженням на організм. На 21 добу реакцію білої крові у відповідь на дію речовини можна вважати компенсаторною, оскільки, після відновлення кількості лейкоцитів, кількість морфологічно змінених клітин була наближеною до контрольних показників.

Відомо, що визначення функціонально-метаболічної активності клітин периферичної крові за допомогою цитохімічних досліджень дозволяє виявити як ступінь зрілості клітин, так і внутрішньоклітинні зрушення, спричинені впливом ксенобіотиків. Згідно з отриманими даними, біохімічні зміни в лейкоцитах почалися на тлі появи молодих клітин гранулоцитарного ряду. Проте до кінця експерименту в процесі дозрівання та відновлення кількісного складу нейтрофілів активність пероксидази, хлорацетатестерази та ліпідів була наближеною до контрольних показників. Отже, зниження ферментативної активності лейкоцитів у певні терміни дослідження (3-14-та доба) є свідченням виходу молодих клітин у периферичну кров.

За гострого впливу карбендазиму на організм щурів-самців останніми відреагували тромбоцити, кількість яких достовірно знизилася на 21-шу добу експерименту. Виявлена тромбоцитопенія може бути свідченням пригнічення тромбоцитопоезу, отримані результати потребують подальших досліджень.

4.2. Дослідження впливу карбендазиму на показники периферичної крові щурів Wistar (самців і самиць) за умов хронічної пероральної інтоксикації

Хронічна інтоксикація карбендазимом у дозах 0, 5, 25, 75 мг/кг маси

тіла тварин проводилася впродовж 104 тижнів. У зазначений період достовірних змін показників червоної крові (кількість еритроцитів, ретикулоцитів, концентрація гемоглобіну) та тромбоцитів не спостерігалось, за винятком слабкого збільшення СГЕ в щурів-самиць через 13 тижнів експозиції карбендазимом у дозах 75 мг/кг (на 6,7 %; контроль – $(1,20 \pm 0,02)$, дослід – $(1,28 \pm 0,01)$) і 5 мг/кг (на 7,5 %; контроль – $(1,20 \pm 0,02)$, дослід – $(1,29 \pm 0,03)$), а також у самців через 39 тижнів експозиції в дозі 25 мг/кг (на 3,5 %; контроль – $(1,15 \pm 0,04)$, дослід – $(1,19 \pm 0,01)$) (дод. Б, табл. Б.1). У самців і самиць щурів, які отримували карбендазим у дозі 75 мг/кг, через 4 тижні досліджень відзначалися морфологічні зміни еритроцитів у вигляді помірного анізоцитозу, а через 104 в самців була відмічена наявність акантоцитів; за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг через 78 тижнів у самиць щурів спостерігалися поодинокі еритрокаріоцити різних ступенів зрілості, через 104 – анізоцитоз і поліхромазія еритроцитів.

Характерним щодо кількісних змін клітин білої крові за впливу карбендазиму в дозі 75 мг/кг у щурів-самців було наступне: через 4 тижні – зменшення кількості лейкоцитів на 26 % (контроль – $(14,46 \pm 0,45)$, дослід – $(10,70 \pm 0,69)$) і базофілів на 100 % (контроль – $(0,60 \pm 0,21)$, дослід – 0), через 39 – еозинофілів на 80 % (контроль – $(3,00 \pm 0,43)$, дослід – $(0,60 \pm 0,64)$). У щурів-самиць через 4 тижні спостерігалось достовірне зниження кількості паличкоядерних нейтрофілів (контроль – $(1,00 \pm 0,43)$, дослід – 0), через 13 – виражене (на 90 %) зменшення кількості еозинофілів (контроль – $(4,20 \pm 1,07)$, дослід – $(0,40 \pm 0,21)$), через 39 – тенденція до еозинопенії, через 52 – відносна еозинопенія на 66,7 % (контроль – $(3,00 \pm 0,64)$, дослід – $(1,00 \pm 0,43)$), через 78 – на 64,3 % (контроль – $(2,80 \pm 0,64)$, дослід – $(1,00 \pm 0,43)$).

В окремі терміни експерименту відзначалися морфологічні зміни клітин білої крові у вигляді хроматинолізу та каріолізу лімфоцитів (13 тижнів) у тварин обох статей, хроматинолізу лімфоцитів (26 тижнів) у щурів-самиць. Через 52 тижні в периферичній крові самиць з'являлися поодинокі бласти, відмічалися достовірне підвищення кількості пролімфоцитів

((1,20±0,21), у контролі – (0,20±0,21)) і тенденція до збільшення чисельності проплазмоцитів. Через 104 тижні в самців була виявлена вакуолізація ядер і цитоплазми моноцитів, у окремих тварин – хроматиноліз нейтрофілів.

Карбендазим у дозі 25 мг/кг через 39 тижнів спричиняв у щурів-самців зниження кількості еозинофілів на 60 % (контроль – (3,00±0,43), дослід – (1,20±0,64)), через 104 – зменшення втричі кількості паличкоядерних нейтрофілів (контроль – (3,00±0,43), дослід – (1,00±0,43)), хроматиноліз ядер нейтрофілів і лімфоцитів, а також появу поодиноких макрофагів у периферичній крові. Через 13 тижнів у самиць були встановлені значне зниження (на 71,4 %) чисельності еозинофілів (контроль – (4,20±1,07), дослід – (1,20±0,43)) і хроматиноліз ядер лімфоцитів, через 52 – зменшення кількості базофілів (контроль – (0,80±0,21), дослід – 0).

При пероральному надходженні карбендазиму в дозі 5 мг/кг через 39 тижнів у щурів-самців відзначалося збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів у 2,3 раза (контроль – (1,40±0,43), дослід – (3,20±0,64)). Через 52 тижні в самиць спостерігалось достовірне підвищення кількості пролімфоцитів (контроль – (0,20±0,21), дослід – (1,00±0,21)), самців – поява поодиноких макрофагів у периферичній крові.

Отримані дані свідчать про відсутність чіткої залежності “доза-час-ефект” за умов хронічної інтоксикації щурів карбендазимом як з боку клітин червоної, так і білої крові. В окремі терміни спостерігалось слабе збільшення СГЕ, в більшості випадків наприкінці дослідження були виявлені анізоцитоз, поліхроматофілія еритроцитів і наявність акантоцитів. Оскільки акантоцитоз є однією з ознак анемії й насамперед обумовлений порушенням ліпідного складу мембран еритроцитів, то не виключено, що при тривалому впливі карбендазиму на організм щурів пошкодження структури еритроцитів може призвести до їхнього гемолізу та розвитку прихованої анемії. Вказані результати можна порівняти з даними, попередньо отриманими в гострому експерименті, де було показано, що карбендазим у високих дозах має виражену анемізуючу дію.

Значущих токсикологічних змін кількості лейкоцитів, лімфоцитів, моноцитів не спостерігалось, проте в окремі терміни досліджень у щурів відзначалися зниження кількості базофілів, еозинофілів, паличкоядерних нейтрофілів і тенденція до моноцитозу, в кров'яному руслі виявлялися поодинокі макрофаги, а також відбувалися морфологічні зміни низки клітин білої крові (лімфоцити, нейтрофіли, моноцити), що може свідчити про порушення імунного статусу організму. Крім того, підвищена кількість моноцитів і поява макрофагів у крові в окремих щурів-самців можуть бути обумовлені наявністю пухлин у цих тварин.

Висновки до розділу 4

1. Зменшення чисельності формених елементів периферичної крові за дії карбендазиму в дозі 750 мг/кг, ймовірно, пов'язане з пригніченням гемопоезу та цитотоксичним впливом речовини. Незважаючи на відповідні відновні та регенеративні процеси клітин еритроїдного ряду, а саме ретикулоцитоз і поліхроматофілію, кількість еритроцитів і рівень гемоглобіну в крові тварин наприкінці експерименту залишилися зниженими, що свідчить про анемізуючу дію карбендазиму. Акантоцитоз еритроцитів є однією з ознак анемії та підтверджує порушення мембранних структур. Лейкопенія, нейтрофілоцитопенія, а також поява в периферичній крові морфологічно змінених і зруйнованих лейкоцитів пов'язані з пригніченням гранулоцитопоезу, впливом на імунну систему та цитотоксичністю карбендазиму; виявлені зміни були зворотними. Зниження ферментативної активності лейкоцитів у певні терміни дослідження є свідченням виходу молодих клітин нейтрофільного ряду в периферичну кров. Тенденція до моноцитозу в окремі терміни експерименту, що корелювала з підвищенням лейколізу клітин, засвідчує мобілізацію механізмів неспецифічної адаптації. Зменшення кількості тромбоцитів вказує на ймовірне пригнічення мегакаріоцитарного диференціювання та проліферації даних клітин у кістковому мозку, що потребує подальших досліджень.

2. За умов хронічного впливу карбендазиму на організм щурів

упродовж 104-тижневої експозиції не встановлено чіткої залежності “доза-час-ефект” як з боку клітин червоної, так і білої крові. Виявлені морфологічні зміни в еритроцитах, а саме анізоцитоз, акантоцитоз і поліхромазія еритроцитів, є свідченням слабкого анемізуючого ефекту, що має прихований характер. Встановлені кількісні та морфологічні зміни клітин білої крові можуть бути пов’язані з порушенням імунного статусу організму.

Основні результати даного розділу висвітлено в наступних публікаціях:

1. Лисовская В.С., Жминько П.Г., Шуляк В.Г. Влияние карбендазима на систему крови крыс в условия хронической пероральной интоксикации. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. №2. Том 1(150). С. 152–156.
2. 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.

РОЗДІЛ 5

МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ОНКОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ КАРБЕНДАЗИМУ

Механізми канцерогенної дії карбендазиму повною мірою є не доведеними та дискусійними. Гепатоканцерогенність карбендазиму без прямих доказів генотоксичності, а саме за відсутності даних щодо індукції анеуплоїдій в органі-мішені [13], дозволяє припустити промоторні властивості речовини.

Окрім того, доведена репродуктивна токсичність карбендазиму та вплив на рівень багатьох гормонів, зокрема тестостерон, лютеїнізуючий, фолікулостимулюючий і гонадотропін-рилізинговий гормони можуть сприяти дисгормональним змінам в організмі та стати причиною розвитку неоплазій.

Оскільки генотоксичність у досліджуваних зразках карбендазиму за результатами вивчення їхньої мутагенної активності, що було проведене в ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової і хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України”, була відсутньою, механізм онкогенезу в сім’яниках самців, а також гіпофізі, щитоподібній і молочній залозах самиць, що був виявлений у попередньому хронічному дослідженні, може бути пов’язаним з ендокринними порушеннями.

5.1. Дослідження ендокриндизрапторних властивостей карбендазиму на ювенільних/передпубертатних щурах-самцях Wistar

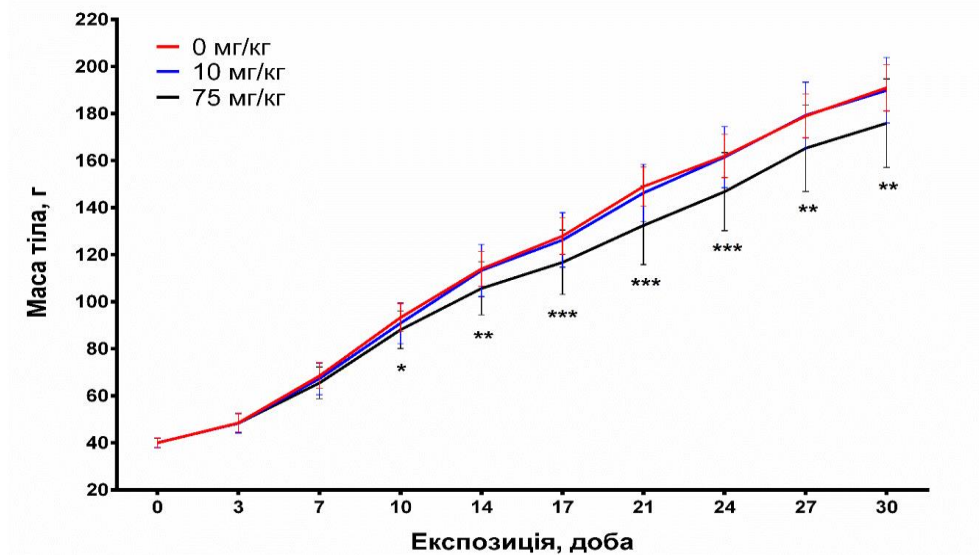
Незважаючи на великий обсяг праць щодо токсичності карбендазиму, дані про його вплив на ендокринну систему суперечливі та не дозволяють зробити однозначні висновки [68, 182]. Для визначення ксенобіотиків, що порушують функцію ендокринної системи, US EPA був розроблений

Протокол експерименту з виявлення змін пубертатного розвитку та функції щитоподібної залози [166]. Дана методика рекомендована як програма першого рівня скринінгу ендокринних дизрапторів. Оскільки розвиток пухлин у сім'яниках (лейдигоми), попередньо виявлених у хронічному експерименті, може бути пов'язаним з порушенням балансу андрогенів, метою подальших досліджень стало вивчення впливу карбендазиму на ендокринну систему на моделі пубертатного розвитку самців-щурів Wistar.

Експеримент був проведений на ювенільних щурах-самцях Wistar за дії карбендазиму в дозах 0, 10 і 75 мг/кг маси тіла.

Упродовж експерименту загибелі тварин у жодній з груп не спостерігалось, клінічних ознак, що б свідчили про його токсичний вплив на організм щурів, не встановлено.

За дії карбендазиму не було виявлено статистично достовірних змін маси тіла щурів, які отримували дозу 10 мг/кг. Водночас за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг, починаючи з 10-ї доби експерименту, у тварин було встановлене статистично достовірне зниження маси тіла на 6-10 % ($p < 0,05$) (рис. 5.1).

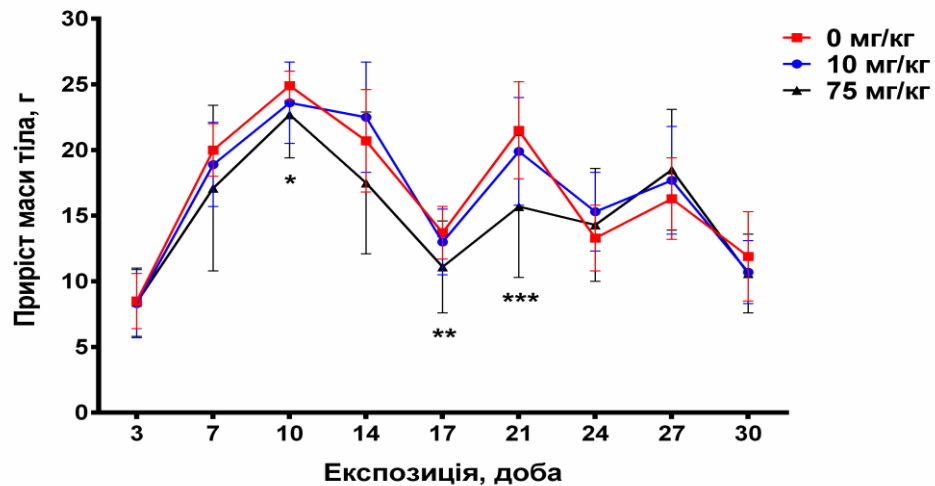


Примітка. * – $p \leq 0,03$; ** – $p \leq 0,02$; *** – $p \leq 0,01$ порівняно з негативним контролем.

Рис. 5.1. Динаміка маси тіла щурів-самців Wistar упродовж експерименту.

Статистично значущих змін приросту маси тіла відносно контролю у тварин, які отримували карбендазим у дозі 10 мг/кг, не встановлено. В окремі терміни дослідження відмічалось як зниження даного показника (на 5-7 %), так і підвищення (на 8-7 %). Виявлені зміни приросту маси тіла тварин не виходили за межі фізіологічної норми.

Значніші зміни приросту маси тіла були зафіксовані у щурів, які отримували високу дозу карбендазиму; зниження спостерігалось на 7- 21-шу добу (на 15 % і 28 % відповідно). На 30-ту добу приріст маси тіла піддослідних тварин був нижчим за масу контрольних щурів на 11 % ($p \geq 0,05$) (рис. 5.2).



Примітка. * – $p \leq 0,03$; ** – $p \leq 0,02$; *** – $p \leq 0,002$ порівняно з негативним контролем.

Рис. 5.2. Динаміка приросту маси тіла щурів-самців Wistar упродовж експерименту.

Коефіцієнт варіації (CV) індивідуальних показників маси тіла у щурів, які отримували високу дозу, на відміну від тварин, які одержували меншу дозу речовини, істотно перевищував значення контролю.

Отже, за критерієм “маса тіла та її приріст” карбендазим у дозі 75 мг/кг виявляв системний токсичний ефект.

Показники, що характеризують пубертатний розвиток щурів, наведені в табл. 5.1.

Узагальнені дані розвитку щурів-самців Wistar у пубертатний період в експерименті з вивчення ендокриндизрапторних властивостей карбендазиму

Показники	Статистичні параметри	Негативний контроль (розчинник), 0 мг/кг	Карбендазим	
			10 мг/кг	75 мг/кг
	N	15	15	15
Вік статевого дозрівання (відділення препуцію), доба	M±SD	42,3±2,0	42,2±1,9	42,3±1,6
	CV, %	5	4	4
	P	-	0,85	1,0
Маса тіла на момент статевого дозрівання, г	M±SD	149,6±10,1	146,9±10,9	134,5±14,8*
	CV, %	7	7	11
	P	-	0,49	0,003
Початкова маса тіла (21-ша доба від народження), г	M±SD	40±2,1	40,1±2,1	40±1,9
	CV, %	5	5	5
	P	-	0,93	1,0
Маса тіла на кінець досліду, г	M±SD	190,7±9,9	189,9±13,9	175,9±18,8*
	CV, %	5	7	11
	P	-	0,86	0,01
Приріст маси тіла, г	M±SD	150,7±8,8	150,1±12,7	135,9±18,4*
	CV, %	6	8	14
	P	-	0,87	0,01

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з негативним контролем за t-критерієм Стьюдента.

Відділення препуцію в щурів-самців Wistar контрольної групи

відбулося в середньому на 42,3 добу. У тварин, які отримували карбендазим у високій і низькій дозах, зазначений показник не відрізнявся від контролю. Маса тіла щурів на момент відділення препуцію за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг зменшувалася на 10,1 % ($p \leq 0,05$). До того ж, у тварин цієї ж групи показники, як-от “маса тіла в кінці дослідження”, “приріст маси тіла на кінець експерименту”, були статистично достовірно зниженими відносно контролю. CV показників у групі тварин, які отримували високу дозу речовини, був вищим порівняно з іншими групами.

Отже, карбендазим за критерієм “відділення препуцію” не впливав на вік статевого дозрівання тварин, проте за дії в дозі 75 мг/кг пригнічував ріст тварин.

На 31-й день експерименту (53 PND), через 24 години після останнього введення карбендазиму, була проведена евтаназія тварин. Під час некроскопії будь-яких відмінностей щодо макроскопічних змін в органах і тканинах тварин виявлено не було. Результати вивчення абсолютної та відносної маси органів подані в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

**Абсолютна та відносна маса органів щурів-самців Wistar у
середньостроковому експерименті з вивчення ендокриндизрапторних
властивостей карбендазиму**

Органи	Негативний контроль (розчинник), 0 мг/кг (n=15)			Карбендазим			
				10 мг/кг (n=15)		75 мг/кг (n=15)	
				M±SD	CV, %	M±SD	CV, %
Печінка, г	U	10,8±1,0	9,2	11,2±1,1	9,4	10,4±1,8	1,8
	A	10,8		11,2		10,4	
	R	56,7±5,07	9	59,3±5,6	9	58,6±6,1	10
Нирки, г	U	1,7±0,1	7,8	1,7±0,2	9,4	1,6±0,2	12
	A	1,7		1,7	9,4	1,6	
	R	9,0±0,75	8	9,1±0,5	6	9,3±0,5	5

Органи	Негативний контроль (розчинник), 0 мг/кг (n=15)			Карбендазим			
				10 мг/кг (n=15)		75 мг/кг (n=15)	
				M±SD	CV, %	M±SD	CV, %
Гіпофіз, мг	U	6,7±0,9	13,5	7,5±1,9	25,5	9,9±1,2*	12
	A	6,7		7,5	25,5	9,9	
	R	35,0±5,0	14	39,8±10,3	26	56,9±7,3*	13
Надниркові залози, мг	U	45,0±3,9	9	45,9±3,7	8,2	48,9±2,9*	6
	A	45,0		45,9		48,9	
	R	236,4±22,1	9	242,1±20,1	8	280,2±27,2*	10
Сім'яні пухирці, мг	U	397,3±117,1	29,5	446,0±90,1	20,2	366,7±85,2	23
	A	397,3		445,1		367,1	
Простата, мг	U	172,7±52,8	30,6	150,7±30,1	20	154,7±37,8	24
	A	172,9		150,3		154,9	
LABC, мг	U	547,3±120,9	22,1	595,3±105,2	17,7	504,7±71,7	14
	A	547,9		594,2		505,2	
Епідидиміси (лівий), мг	U	234,0±24,1	10,3	246,0±32,5	13,2	279,3±66,2*	24
	A	234,2		245,7		279,5	
Епідидиміси (правий), мг	U	233,3±29,2	12,5	236,7±38,5	16,3	272,7±50,4*	18
	A	233,5		236,4		272,8	
Сім'яники (лівий), мг	U	1262±116,3	9,2	1296,7±95,7	9,4	888±151,1*	17
	A	1262,4		1295,9		888,4	
Сім'яники (правий), мг	U	1282±104,5	8,2	1305,3±123,3	9,4	919±172,4*	19
	A	1282,4		1304,5		919,1	
Щитоподібна залоза, мг	U	110,2±114,3	12,9	115,2±111,6	10,1	104,9±9,1	9
	A	110,2		115,2		105	
	R	577,6±68,8	12	608,6±65,2	11	602,2±75,8	13

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем за t-критерієм

Стьюдента; A (Adjusted) – відкореговані абсолютні показники відносно PND23; U (Unadjusted) – не відкореговані абсолютні показники відносно PND23; R (Relative) – показники відносно кінцевої маси тіла.

Згідно з даними аналізу абсолютної маси внутрішніх органів, у тварин, які отримували карбендазим у дозі 10 мг/кг, статистично достовірних змін не встановлено. Було виявлене статистично недостовірне збільшення абсолютної маси гіпофізу та сім'яних міхурців (на 12 %), LABC (на 9 %), печінки, щитоподібної та надниркових залоз (на 4-5 %). Спостерігалось зниження маси передміхурової залози на 12 % ($p \geq 0,05$).

У дозі 75 мг/кг відмічалось статистично достовірне збільшення абсолютної маси гіпофізу (на 49 %), надниркових залоз (на 9 %), епідидимісів (на 17/19 %) і зниження маси сім'яників (на 28/30 %; $p \leq 0,05$). Зміни абсолютної маси інших органів були статистично не значущими; спостерігалось зниження маси передміхурової залози (на 10 %), сім'яних міхурців і LABC (на 8 %), печінки, щитоподібної залози та нирок (на 5 %).

Статистично достовірне збільшення відносної маси було виявлене в гіпофізі та надниркових залозах (на 62 % та 19 % відповідно).

Вивчаючи залежність доза-ефект за допомогою регресійного аналізу, встановили статистично достовірну кореляцію між змінами абсолютної маси гіпофізу та сім'яників, а також відносної маси гіпофізу та надниркових залоз. Коефіцієнт кореляції становив 0,71 і 0,79, а також 0,77 і 0,65 відповідно ($p \leq 0,05$).

Отже, вплив карбендазиму в дозі 75 мг/кг на ювенільних тварин спричиняв збільшення маси гіпофізу, надниркових залоз, епідидимісів і зниження маси сім'яників.

Надалі були проведені гістологічні дослідження щитоподібної залози, епідидимісів і сім'яників тварин (табл. 5.3).

Гістоструктурні та морфофункціональні зміни в органах щурів Wistar в умовах середньострокового експерименту з вивчення ендокриндизрапторних властивостей карбендазиму

Гістоструктурні та морфофункціональні зміни	Негативний контроль (розчинник), 0 мг/кг		Карбендазим			
	(розчинник), 0 мг/кг		10 мг/кг		75 мг/кг	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
n	15		15		15	
Щитоподібна залоза						
Помірно виражене кровонаповнення судин і капілярів строми	3	20	4	26	4	26
Десквамація окремих/груп тироцитів	4	26	4	26	4	26
Кістозна трансформація окремих фолікулів	1	6	4	26	5	33
Епідидиміси						
Клітинний детрит у поодиноких каналцях	0		2	13	3	20
Клітинний детрит, дрібнокрапельний еозинофільний вміст, багатоядерні гігантські клітини, зменшення кількості та/або відсутність сперми в окремих або чисельних каналцях	0		3	20	11*	73
Дистрофія епітелію окремих каналців	0		0		3	20

Гістоструктурні та морфофункціональні зміни	Негативний контроль (розчинник), 0 мг/кг		Карбендазим			
			10 мг/кг		75 мг/кг	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
n	15		15		15	
Сім'яники						
Повнокров'я окремих судин строми	1	6	0		2	13
Десквамація клітин сперматогенного епітелію	2	13	0		3	20
Стоншення епітелію в окремих каналцях	0		0		2	13
Зменшення рядності й атрофія сперматогенного епітелію в окремих або чисельних каналцях	0		1	6	11*	73

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем за однібічним точним критерієм Фішера.

Під час гістологічного аналізу зразків щитоподібної залози піддослідних щурів не було виявлено істотних змін у паренхімі та стромі органа. Залоза мала характерну часточкову структуру. Сполучнотканинні міжчасточкові та міжфолікулярні перетинки звичайних розмірів, дифузно інфільтровані поодинокими тканинними базофілами. Гемодинамічна реакція стромы без особливостей. Фолікули переважно середнього розміру. Тиреоїдний епітелій здебільшого кубічний. Колоїд зазвичай гомогенний світло-рожевого кольору. У деяких самців у окремих фолікулах зустрічалися десквамація тиреоцитів і випадки кістозної трансформації (рис. 5.3).

В епідидимісах були виявлені дистрофічні зміни епітелію каналців, клітинний детрит, візуально помітне зменшення кількості сперматогенної

субстанції та/або відсутність сперматогенної субстанції як у поодиноких, так і в численних каналцях, наявність багатоядерних дегенеративних клітин. У сім'яниках відмічалися десквамація клітин сперматогенного епітелію, дегенеративні зміни, порушення цілісності епітелію, атрофія та некроз (рис. 5.4).

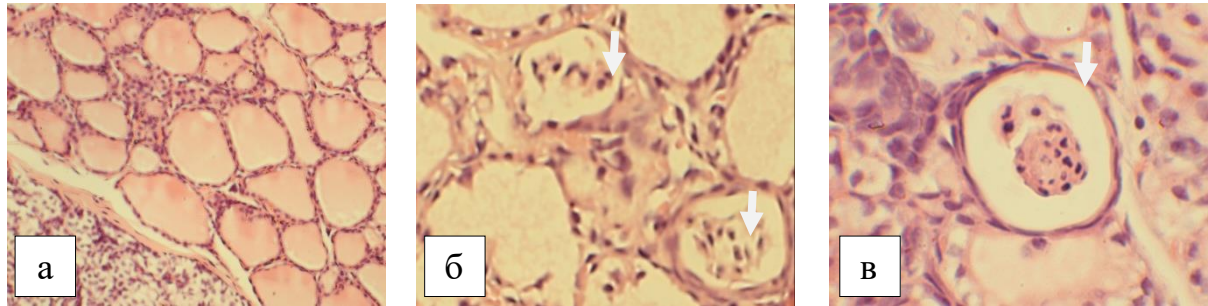


Рис. 5.3. Гістоморфологічні зміни в щитоподібній залозі ювенільних щурів Wistar. Нормальна структура залози (а). Вплив карбендазиму в дозі 75 мг/кг – десквамація тиреоцитів (а); кістозна трансформація фолікула (б). Забарвлення гематоксилін та еозин; ×400 (б), ×600 (в).

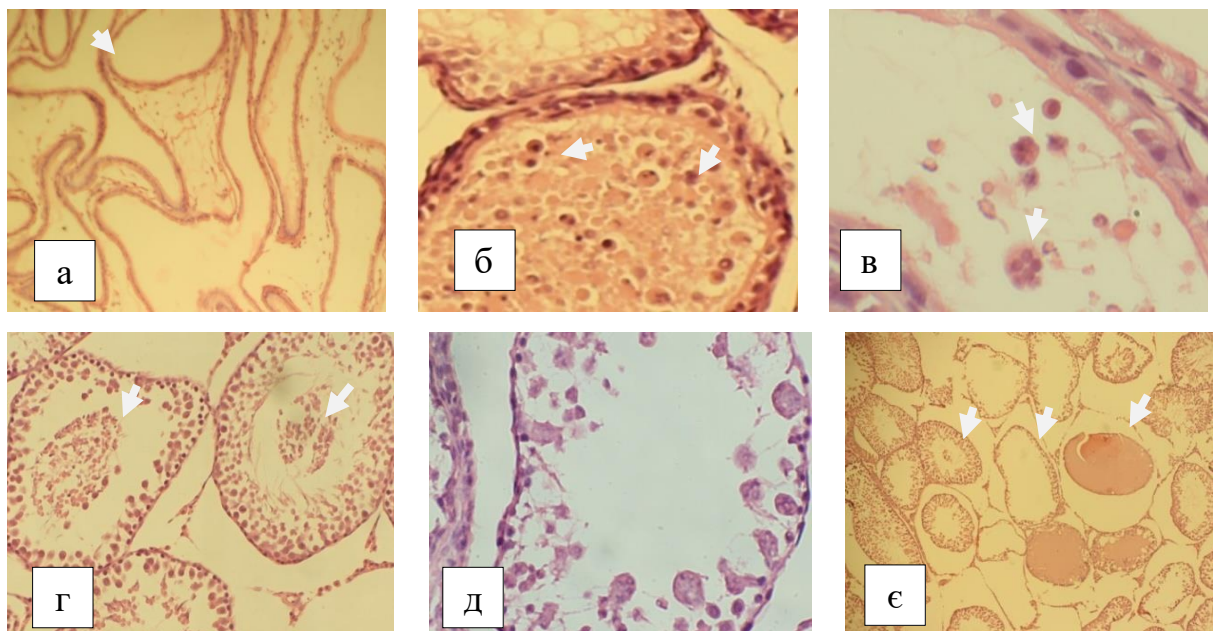


Рис. 5.4. Гістоморфологічні зміни в епідидимісах і сім'яниках ювенільних щурів Wistar. Вплив карбендазиму в дозі 75 мг/кг – дегенеративні зміни епітелію та відсутність сперми в каналцях епідидимісу (а); клітинний детрит у просвіті каналців початкового сегмента (б); гігантські багатоядерні клітини (в); десквамація клітин сперматогенного

епітелію (г); дегенеративно-атрофічні зміни епітелію сім'яників (д); десквамація, зменшення рядності, атрофія епітелію та некроз (є). Забарвлення гематоксилін та еозин; $\times 100$ (а, є), $\times 200$ (г), $\times 400$ (б, д), $\times 600$ (в).

Деструктивні та морфофункціональні зміни в епідидимісах щурів, які отримували карбендазим у максимальній дозі, були виявлені в 11 з 15 тварин (73 % випадків; $p \leq 0,05$). У групі щурів, які одержували мінімальну дозу речовини, подібні прояви зустрічалися значно рідше (в 3 тварин, що становить 20 % відповідно). Цей показник був статистично недостовірним порівняно з негативним контролем. У контрольних тварин таких змін не зафіксовано.

У сім'яниках щурів, які отримували максимальну дозу карбендазиму, спостерігалися десквамація клітин сперматогенного епітелію (20 %) і деструктивно-атрофічні зміни (73 %; $p \leq 0,05$). У тварин контрольної групи таких проявів відмічено не було.

Отже, в ювенільних щурів за дії карбендазиму в дозі 10 мг/кг за результатами гістоморфологічних досліджень щитоподібної залози, епідидимісів і сім'яників не було встановлено істотних відмінностей морфоструктурних змін порівняно з контрольними тваринами. Випадки помірного повнокров'я судин і капілярів строми щитоподібної залози та сім'яників були поодинокими, спостерігалися у тварин усіх експериментальних груп. Випадки візуально виявленого зменшення кількості сперматогенної субстанції та/або її відсутності, наявності клітинного детриту в окремих каналцях епідидимісів також були нечисельними.

За дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг аналогічні зміни у тварин були більш вираженими порівняно з тими, які отримували карбендазим у дозі 10 мг/кг. Десквамація клітин сперматогенного епітелію, зменшення рядності, порушення цілісності й атрофія епітелію звивистих каналців сім'яників спостерігалися лише у тварин цієї експериментальної групи, що може розцінюватися як прояв антиандрогенного ефекту досліджуваної речовини.

5.2. Дослідження промоторної дії карбендазиму за умов середньострокової пероральної інтоксикації на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”

Порушення метаболічних процесів у клітинах проявляються в змінах активності ферментів, що можуть слугувати маркерами трансформації клітин. При ідентифікації канцерогенності технічних продуктів за допомогою середньострокових тестів одним з маркерів пренеопластичних популяцій гепатоцитів є гамма-глутамілтрансфераза. ГГТ класифікується як раково-ембріональний фермент, посилена експресія якого спостерігається в гепатоцелюлярних карциномах, фетальних гепатобластомах, переднеопластичних гепатоцитах і свідчить про клітинну дедиференціацію та реверсію гепатоцитів до фенотипу плода [184].

Експеримент був проведений на 50 щурах-самцях, порівну розподілених залежно від дози карбендазиму на 3 піддослідних групи, групу негативного контролю (розчинник) та групу позитивного контролю (фенобарбітал як класичний промотор). Дози 25 і 75 мг/кг були обрані відповідно до досліджень канцерогенності продукту в хронічному експерименті; максимальна доза становила 300 мг/кг, що відповідало 1/5 від LD50.

У ході експерименту в щурів піддослідних груп не було зафіксовано клінічних симптомів токсичної дії карбендазиму: відмінностей у поведінці, рухливості, апетиті, диханні, шкірі та покриві, слизових оболонках піддослідних і контрольних тварин не спостерігали. Смертність тварин була пов'язана з оперативним втручанням (у групах негативного та позитивного контролю, в групах, які отримували карбендазим у дозах 75 та 300 мг/кг, загинуло по 1 тварині). Під час патологоанатомічного розтину тварин, яким вводили карбендазим, не було виявлено макроскопічних змін у внутрішніх органах і тканинах порівняно з негативним контролем.

Кількісні показники промоторного ефекту карбендазиму в умовах проведеного експерименту наведені в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Морфометричні показники гістохімічного виявлення гамма-глютамілтрансфераза(ГГТ) -позитивних вузликів гепатоцитів в умовах середньострокового експерименту з вивчення промоторної дії карбендазиму

Група/доза	Кількість тварин		ГГТ-позитивні вузлики		
			кількість, см ²	площа, мм ² /см ²	середня площа, мм ²
	усього/з вузликами	%	M±m	M±m	M±m
Негативний контроль (розчинник), 0 мг/кг	9/1	11	0,29±0,88	0,04±0,11	0,01±0,04
Позитивний контроль (фенобарбітал), 37,5 мг/кг	9/9 ^{*,**}	100	24,8±9,59 ^{*,**}	5,14±2,22 ^{*,**}	0,2±0,08 ^{*,**}
Карбендазим, 25 мг/кг	10/1	10	0,86±2,87	0,09±0,27	0,01±0,03
Карбендазим, 75 мг/кг	9/4	44	4,67±5,78 [*]	0,64±0,84	0,06±0,07
Карбендазим, 300 мг/кг	9/2	22	2,89±6,01	0,30±0,63	0,02±0,05

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з негативним контролем за t-критерієм Стюдента; ** – статистична достовірність ($p \leq 0,05$) порівняно з негативним контролем за U-критерієм Манна-Уїтні.

Аналіз отриманих результатів свідчив, що за кількістю тварин, у печінці яких були виявлені ГГТ-позитивні вузлики, між групами (за винятком позитивного контролю) була відсутня достовірна різниця.

Статистично достовірне збільшення кількості вузликів порівняно з негативним контролем було встановлене в щурів, які отримували карбендазим у дозі 75 мг/кг: 4,67 проти 0,29 мм²/см² у контролі. В інших

піддослідних групах у мінімальній і максимальній дозах дані показники не відрізнялися від контрольних.

Фенобарбітал, що використовувався в якості класичного промотора в позитивному контролі, спричиняв достовірне збільшення загальної кількості, площі та середнього розміру ГГТ-позитивних вузликів, що свідчило про високу чутливість моделі (рис. 5.5а).

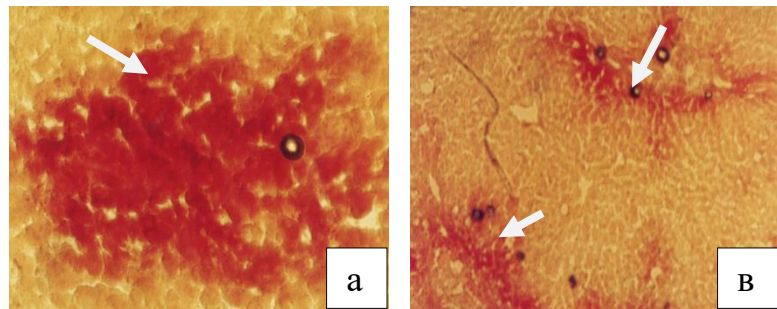


Рис. 5.5. ГГТ-позитивні вузлики в тканині печінки щурів Wistar. Позитивний контроль, фенобарбітал (а); вплив карбендазиму в дозі 75 мг/кг (б). Гістохімічна реакція, метод азосполучення $\times 400$ (а), $\times 200$ (б).

Проліферація та селекція клонів трансформованих клітин печінки призводять до утворення переднеопластичних вузликів. Кількість і розміри вузликів характеризують передпухлинний стан і є основними критеріями промоторної активності досліджуваної речовини [168, 184, 219-221].

У проведеному експерименті за дії фенобарбіталу кількість ГГТ-позитивних вузликів була достовірно збільшеною порівняно з негативним контролем. У тварин, які отримували карбендазим у дозі 25 мг/кг маси тіла, достовірної різниці виявлено не було. У щурів у дозі 75 мг/кг даний показник був достовірно збільшеним. У дозі 300 мг/кг порівняно з негативним контролем достовірної різниці не відзначено.

Іншим кількісним показником ефекту є площа вузликів, що вказує на здатність чинника підсилювати ефект. У проведеному експерименті площа вузликів у печінці щурів з групи позитивного контролю була достовірно збільшеною порівняно з аналогічним показником у тварин з групи негативного контролю. У щурів, які отримували карбендазим у дозах 25 і

300 мг/кг, достовірної різниці виявлено не було. У дозі 75 мг/кг була відмічена тенденція до збільшення площі ГГТ-позитивних вузликів: 0,64 проти 0,04 мм²/см² у негативному контролі (p=0,06). На рис. 5.6 представлений графік розмірів вузликів, виявлених у печінці щурів різних груп, що демонструє істинний розподіл розмірів ініційованих вузликів.

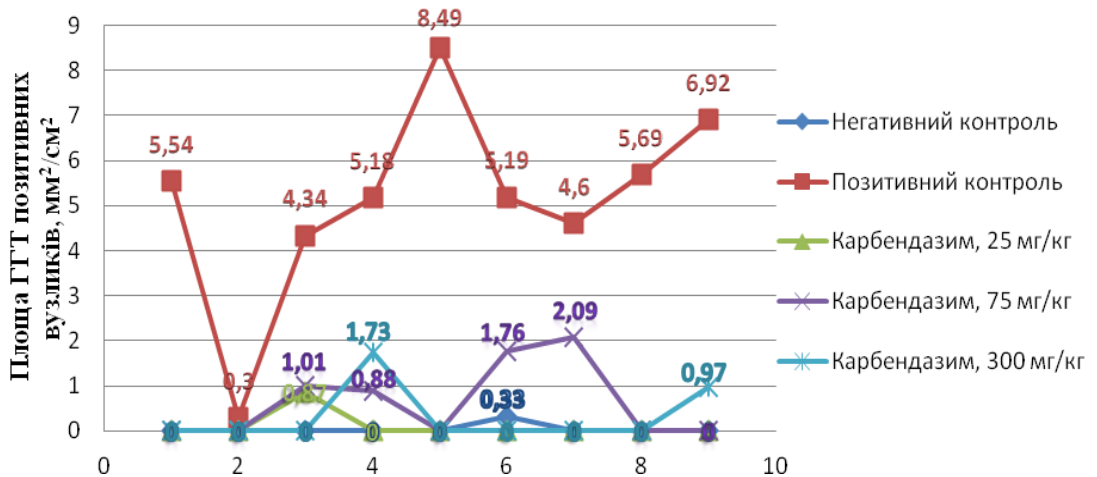


Рис. 5.6. Площа ГГТ-позитивних вузликів по групам в залежності від дози карбендазиму.

Інтегральним показником проліферації трансформованих гепатоцитів є “середня площа ГГТ-позитивних вузликів”. З наведених даних видно, що в печінці щурів, які отримували фенобарбітал, середня площа вузликів була достовірно збільшеною. У тварин, за дії карбендазиму в дозах 25, 75 і 300 мг/кг, цей показник достовірно не відрізнявся від групи негативного контролю як за критерієм Стюдента, так і Манна-Уїтні (p≥0,05).

Отже, в умовах проведеного експерименту карбендазим не проявив властивостей, характерних для класичних промоторів, оскільки не було виявлено залежності ефекту від дози речовини. Достовірні зміни одного з показників (кількість вузликів) як свідчення слабого промоторного ефекту були відмічені лише за дії середньої з вивчених доз речовини (75 мг/кг маси тіла). За умови впливу карбендазиму в максимальній дозі (300 мг/кг)

достовірної різниці з негативним контролем за жодним з показників виявлено не було.

Відомо, що окремі гіперпластичні вузлики прогресують і дають початок неоплазіям, інші регресують [168]. Регресія гіперпластичних вузликів спостерігається переважно тоді, коли в печінці відмічаються некротичні зміни. Не виключено, що некроз гепатоцитів також відбувався за дії карбендазиму в дозі 300 мг/кг. На користь такого припущення, а саме цитотоксичності карбендазиму у високих дозах, свідчать результати проведених нами досліджень та літературні дані [35, 136, 180].

Висновки до розділу 5

1. За впливу карбендазиму на організм ювенільних щурів у дозі 10 мг/кг за фізіологічними та морфофункціональними ознаками (затримка відділення препуцію, дозозалежна зміна маси тіла, зміна абсолютної маси статевих органів, органів ендокринної системи) не встановлено чітких свідчень порушень балансу статевих гормонів. Незначне зниження абсолютної маси гіпофізу та надниркових залоз знаходиться в межах фізіологічних коливань. У тварин за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг виявлене зниження маси тіла, приросту маси тіла, маси тіла на момент статевого дозрівання (відділення препуцію), зменшення абсолютної маси сім'яників, збільшення абсолютної маси епідидимісів, абсолютної та відносної маси гіпофізу та надниркових залоз. Під час гістоморфологічного дослідження в епідидимісах і сім'яниках самців за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг встановлені деструктивно-атрофічні зміни, зокрема в просвітах каналців епідидимісів спостерігалися клітинний детрит, зменшення кількості сперматогенної субстанції та її відсутність. У сім'яниках відзначені десквамація клітин сперматогенного епітелію, зменшення рядності й атрофія епітелію звивистих каналців. У контрольній групі тварин подібних проявів не встановлено. Виявлені гістоморфологічні та морфофункціональні порушення сім'яників призводять до активації гіпофізу та надниркових залоз. Зменшення маси тіла тварин на момент статевого дозрівання, а також

морфофункціональні зміни в осі “гіпофіз – кора надниркових залоз – гонади” є ознакою дисгормональних перемін в організмі тварин і можуть свідчити про ендокриндизрапторну дію карбендазиму.

2. При випробуванні карбендазиму на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія” в щурів підвищення активності ГГТ було встановлене в групі тварин, які отримували нижчу дозу речовини. Досліджувані параметри у вищій дозі були наближеними до контрольних показників. Отже, збільшення кількості гепатоцитів, експресуючих ГГТ в дозі, еквівалентній 75 мг/кг, є свідченням промоторної дії карбендазиму, а виявлена динаміка залежності доза-ефект може вказувати на “парадоксальний” характер.

Основні результати даного розділу висвітлено в наступних публікаціях:

1. Баглей Е.А., Лисовская В.С., Недопитанская Н.Н. Особенности влияния карбендазима на эндокринную систему и пубертантное развитие крыс самцов. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*. 2015. №3(71). С. 34–47.
2. 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. Том 2(154). С. 130–135.

Експериментально-методичні статті:

3. 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.
4. Omelchuk S, Syrota A, Vavrinevych O, Blagaia A, Lisovska V, Reshavska O. 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. N7. Том LXXI. С. 1274-81.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Великі обсяги застосування карбендазиму у світі та неоднозначність висновків щодо канцерогенної дії обумовлюють проведення додаткових досліджень з ідентифікації його канцерогенності.

Вивчення канцерогенності карбендазиму було проведене в хронічних експериментах на двох видах тварин (щурах і мишах) згідно з вітчизняними та міжнародними вимогами до таких досліджень (IARC, OECD) [150-152, 155, 156].

Упродовж 104 тижнів щури Wistar внутрішньошлунково отримували карбендазим у дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла на добу. Рівні доз були встановлені з урахуванням літературних даних [33]. Максимальна доза на початку експерименту була обрана на рівні 125 мг/кг, проте через зниження приросту маси тіла самців (до 28 %) і самиць (до 13 %) за 6 тижнів доза була знижена до 75 мг/кг.

Аналізуючи зміни маси тіла щурів упродовж експерименту, встановили відсутність впливу речовини на цей показник у тварин обох статей за дії речовини в дозах 5 і 25 мг/кг. Маса тіла самців і самиць щурів, які отримували карбендазим у максимальній дозі, знижувалася, що дозволило оцінити дозу 75 мг/кг маси тіла як максимально витривалу в хронічному експерименті.

Специфічних клінічних симптомів і загибелі тварин, яка була б пов'язана з дією речовини, не встановлено. Виживаність контрольних самців і самиць була нижчою порівняно з тваринами експериментальних груп через інтеркурентні захворювання. Отримані показники виживаності тварин усіх піддослідних груп підтверджували адекватність експерименту [151, 161].

Оцінку канцерогенності речовини проводили за критеріями, розробленими IARC [156]: частота пухлин, латентний період, коефіцієнт множинності, співвідношення злоякісних і доброякісних пухлин, а також аналіз гістоморфологічного спектра новоутворень, смертності тварин з

пухлинами, залежності доза-ефект.

Під час патологоанатомічного дослідження тварин усіх експериментальних груп новоутворення були виявлені в щитоподібній (62) і молочній (43) залозах, гіпофізі (31), сім'яниках (16), надниркових залозах (10), печінці (8), яєчниках (5), матці (4), легенях (3), мозку (1), гарднеровій залозі (1), стравоході (1), підшлунковій залозі (1), а також в гемопоетичній системі (19), м'яких тканинах (7) і шкірі (3).

Відмінностей гістоморфологічного спектра пухлин у тварин, які отримували карбендазим, порівняно з контрольними не встановлено. Локалізація та гістоморфологічний тип виявлених пухлин у щурів контрольних і піддослідних груп були характерними для спонтанного онкогенезу даного виду та породи тварин [186-189].

Серед новоутворень переважали дисгормональні пухлини, в самців – пухлини щитоподібної залози, сім'яників, надниркових залоз, гіпофізу, молочної та підшлункової залоз, частота яких залежно від дози карбендазиму (0, 5, 25 і 75 мг/кг) становила 10/60, 14/60, 21/60, 10/60 відповідно. Частота інших новоутворень у самців складала 2/60, 10/60, 5/60, 3/60 відповідно. У самиць серед дисгормональних новоутворень були виявлені пухлини гіпофізу, щитоподібної, молочної та надниркових залоз, матки й яєчників, частота яких залежно від дози карбендазиму (0, 5, 25 і 75 мг/кг) становила 17/60, 37/60, 32/60, 30/60 відповідно. Частота інших новоутворень у самиць складала 6/60, 8/60, 8/60 і 3/60. Наведені дані разом зі збільшенням частоти пухлин демонструють відсутність залежності “доза-ефект”, що не дозволяє дійти висновку про пряму канцерогенну дію карбендазиму. Проте отримані результати за сумарною частотою дисгормональних новоутворень у самців показують їх максимальне зростання за дії середньої дози, водночас у самиць простежується зворотна залежність від дози; за пухлинами іншої локалізації в самців була відмічена тенденція до зменшення їх частоти зі збільшенням дози, в 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.

При оцінці частоти пухлин при попарному порівнянні з контролем, а також виявлення тренду [151, 161] в щурів-самиць були показані достовірне збільшення загальної частоти пухлин щитоподібної залози за дії карбендазиму в дозі 5 мг/кг стосовно загальної кількості тварин ($p=0,042$) і недостовірне щодо ефективного числа тварин ($p=0,096$) за рахунок статистичного збільшення аденом ($p=0,04$); достовірне зростання загальної частоти пухлин молочної залози за дії карбендазиму в дозах 5 і 25 мг/кг ($p=0,04$ та $p=0,01$ відповідно) за рахунок недостовірного збільшення чисельності фіброаденом ($p=0,09$ і $p=0,06$ відповідно); а також достовірне зростання частоти пухлин гіпофізу ($p=0,04$) за рахунок збільшення кількості аденом ($p=0,047$) за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг. Позитивний тренд розвитку пухлин гіпофізу з дозою був статистично підтверджено ($p=0,04$).

У щурів-самців були встановлені достовірне зростання кількості лейдигом за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг стосовно загальної кількості тварин ($p=0,02$) і недостовірне щодо ефективного числа ($p=0,06$). Водночас спостерігався статистично значущий ($p=0,03$) позитивний тренд з лейдигом.

Отже, онкогенний потенціал карбендазиму може бути охарактеризований як опосередкований і “прихований”, про що також свідчать загальні показники канцерогенного ефекту.

В умовах проведеного експерименту не була виявлена різниця між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин. Метастазуюча пухлина (аденокарцинома гіпофізу з метастазами в легені) виникла в єдиному випадку в самиці, яка отримувала карбендазим у дозі 25 мг/кг. Коефіцієнт множинності пухлин у піддослідних і контрольній групах також статистично не відрізнявся. Кількість доброякісних новоутворень перевищувала чисельність злоякісних у всіх експериментальних групах тварин.

Згідно з аналізом отриманих даних, було показано, що кількість пухлин

у щурів, які отримували карбендазим у дозах 5 і 25 мг/кг, зростала, водночас у самиць статистично достовірно ($p \leq 0,05$).

Зменшення частоти індукованих пухлин за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг може бути пов'язаним з його антипроліферативними та, відповідно, протипухлинними властивостями, що проявляються на рівні високих доз. Відомо, що карбендазим інгібує проліферацію пухлинних клітин ссавців, зокрема мультирезистентних і p53-дефіцитних клітинних ліній меланоми, раку грудної залози, яєчників і товстої кишки. Антипроліферативна дія карбендазиму обумовлена його здатністю зупиняти клітинний цикл у G2/M фазі з наступним індукуванням апоптозу [50, 128, 190].

Час виявлення першої пухлини та тривалість середнього латентного періоду розвитку новоутворень у піддослідних і контрольній групах були співставними. Середня тривалість життя тварин з пухлинами, які отримували карбендазим, не відрізнялася від контрольних. Під час гістологічних досліджень внутрішніх органів піддослідних тварин, що були проведені через 52 тижні (проміжна евтаназія тварин), були діагностовані поодинокі випадки передпухлинних станів (залозиста гіперплазія матки й осередкова лейдигоклітинна гіперплазія). Аналіз непухлинної патології, встановленої на термінальній стадії експерименту, показав, що дія карбендазиму в дозах 25 і 75 мг/кг спричиняє дозозалежні деструктивні зміни в сім'яниках, що часто призводять до атрофії, а також лейдигоклітинної гіперплазії.

У дослідженні, проведеному на мишах лінії СВА в умовах хронічного 18-місячного експерименту, тварини отримували карбендазим внутрішньошлунково в дозах 0, 5, 25 і 75 мг/кг маси тіла на добу. У результаті клінічних обстежень, що виконували впродовж експерименту, не було виявлено порушень фізіологічного стану тварин. Маса тіла самців і самиць, які отримували речовину у різних дозах, не змінювалася як при порівнянні піддослідних груп між собою, так і відносно контрольних тварин.

Вживаність піддослідних мишей упродовж експерименту достовірно не відрізнялася від контрольних. У самців, які отримували речовину у

низькій і середній дозах, смертність у другій половині дослідження (10-14 місяців) була вищою, ніж у контрольних тварин і тих, які одержували максимальну дозу, а наприкінці експерименту достовірно збільшилася ($p \leq 0,05$) проти контролю. У мишей-самиць у ті ж терміни експерименту смертність зростала за дії карбендазиму в максимальній дозі 75 мг/кг. Водночас за показником виживаності тварин проведений експеримент відповідав вимогам досліджень на канцерогенність (був адекватним) [151, 161].

Відомо, що мишам лінії СВА притаманна коротка тривалість життя, особливо самцям, що пов'язують з їхньою високою чутливістю до дефіциту вітаміну К і відповідним виникненням внутрішніх кровотеч; загальна частота спонтанних пухлин у цих тварин може сягати 29 % [174].

Під час патологоанатомічного дослідження загиблих тварин і тих, які підлягали евтаназії, пухлини були виявлені в печінці (15), легенях (8), молочній залозі (5), матці (3), яєчниках (3), гемопоетичній системі (3). Гістоморфологічний спектр новоутворень у мишей контрольної та піддослідних груп був характерним для даних виду та лінії тварин [175]. Серед пухлин печінки та легень були діагностовані аденоми й аденокарциноми; молочної залози – аденокарциноми та саркоми; матки – аденоми, аденокарциноми, саркоми. В яєчниках відмічалися гранульозоклітинні пухлини та текоми, гемопоетичній системі – лімфосаркоми. Частота пухлин визначалася відносно ефективного числа з урахуванням інтеркурентної смертності тварин. Під час статистичного аналізу не було виявлене збільшення загальної частоти пухлин мишей обох статей у піддослідних групах порівняно з контролем.

Не було встановлено статистично значущої різниці між частотою злоякісних пухлин, діагностованих у піддослідних і контрольних тварин. Метастатичні та множинні пухлини в експерименті були відсутніми. У самців кількість доброякісних пухлин превалювала над злоякісними. У самиць, навпаки, було виявлено більше злоякісних пухлин: у контрольній

групі співвідношення новоутворень (доброякісні/злаякісні) становило 3/5; у тварин, які отримували карбендазим у дозах 5 і 25 мг/кг, – 2/2 і 3/3 відповідно; у дозі 75 мг/кг були діагностовані лише 2 злаякісних новоутворення різної локалізації за відсутності доброякісних. У самців пухлини найчастіше виявлялися в печінці, їхня частота за дії карбендазиму в дозах 25 і 75 мг/кг зростає до 8,8 % і 13,3 % порівняно з 3,6 % у контрольних тварин. Відомо, що карбендазим підвищує саме частоту пухлин печінки в самців і самиць мишей CD-1 і Swiss, на підставі чого його було класифіковано як гепатоканцероген. Проте на мишах лінії NMRKf ефект не був встановлений [33]. Поясненням цього може бути генетична схильність мишей CD-1 і Swiss до спонтанного онкогенезу.

Першими новоутвореннями, виявленими в проведеному експерименті на мишах лінії СВА, були пухлини печінки. Скорочення їхнього латентного періоду не спостерігалось, всі неоплазії були діагностовані у тварин піддослідних груп пізніше, ніж у контрольній.

Тривалість середнього латентного періоду пухлин у самців, які отримували карбендазим, була вищою, ніж у контрольних тварин ($p \leq 0,05$), самиць – суттєво не відрізнялася від контрольних показників.

Також не було виявлене скорочення СТЖ мишей з пухлинами, які отримували карбендазим, порівняно з контрольними тваринами. Ба більше, СТЖ самців з пухлинами була вищою порівняно з величиною цього показника в усіх самців, взятих в експеримент. У самиць, які отримували карбендазим у дозі 75 мг/кг, спостерігалось достовірне ($p \leq 0,05$) зростання СТЖ у тварин з пухлинами порівняно з усіма мишами в групі.

Отже, в експерименті, проведеному на мишах лінії СВА, не було виявлено канцерогенної активності карбендазиму, хоча підвищення частоти пухлин печінки все ж спостерігалось.

Основною ключовою подією механізму трансформації нормальних клітин у пухлинні є генотоксичний ефект, що призводить до відповідної мутації в геномі клітини [151, 191]. Він може реалізуватися як через пряму

дію на клітину, так і опосередковано. Генотоксичний ефект карбендазиму полягає в його безпосередньому втручанні в роботу генетичного апарату клітини. Він взаємодіє з тубуліном і блокує його полімеризацію на стадії мітозу, що порушує рівномірний розподіл генетичного матеріалу. Такий ефект карбендазиму можливий у проліферуючих тканинах. Інший механізм генотоксичного ефекту карбендазиму, а саме через безпосередню взаємодію з ДНК й утворення аддуктів і її модифікації, виключається на підставі результатів чисельних досліджень, проаналізованих у роботах і представлених у літературі [192, 193]. Слід відзначити, що під час вивчення мутагенності зразків технічних продуктів генеричного карбендазиму, що були використані в проведеній роботі, в тесті на індукцію генних мутацій на бактеріальних клітинах *S. Typhimurium* (штами TA98, TA100) ефект не був встановлений.

Отже, однією з можливих передумов онкогенного ефекту карбендазиму є проліферація клітин. Найбільш імовірною мішенню такої дії є вплив на клітини кісткового мозку та, відповідно, систему крові.

Дія карбендазиму на систему крові щурів була вивчена за умов гострої та хронічної інтоксикації.

За одноразової дії карбендазиму в дозі 750 мг/кг на початкових термінах експерименту (1-ша і 3-тя доба) у тварин була виявлена ретикулоцитопенія ($p \leq 0,05$), на 7-му добу – зменшення кількості еритроцитів на 8 % ($p \geq 0,05$). Упродовж дослідження спостерігалися морфологічно змінені еритроцити (акантоцити). Незважаючи на відповідні відновні та регенеративні процеси (ретикулоцитоз і поліхроматофілія), кількість еритроцитів і рівень гемоглобіну в крові щурів на кінець дослідження (14-та і 21-ша доба) були достовірно зниженими (на 18 % і 10 % відповідно; $p \leq 0,05$), що було свідченням анемізуючої дії карбендазиму. Причиною акантоцитозу за умови гострого впливу карбендазиму може бути порушення структури та функції мембран еритроцитів, а також опосередкована гепатотоксична дія [177-179].

Ймовірною причиною тромбоцитопенії (31 %; $p \leq 0,05$), виявленої на 21-шу добу експерименту, було пригнічення мегакаріоцитарного диференціювання та проліферації, отримані дані потребують подальших досліджень.

Встановлені на 3-тю добу лейкопенія, нейтрофілоцитопенія (27 % і 66 %; $p \leq 0,05$) і збільшення кількості клітин лейколізу (на 100 %; $p \leq 0,05$) були ознакою цитотоксичної дії карбендазиму на лейкоцити та клітини гранулоцитарного ряду. Надалі гранулоцитопенія відновилася, що було підтверджено цитохімічними дослідженнями. Збільшення кількості молодих лейкоцитів супроводжувалося зниженням активності, пероксидази, хлорацетатестерази та вмісту ліпідів у нейтрофілах; наприкінці експерименту в міру дозрівання клітин активність ферментів і вміст ліпідів підвищилися та були наближеними до контрольних показників.

Отже, вплив карбендазиму на периферичну кров щурів на рівні дози 750 мг/кг свідчив про його цитотоксичну дію й анемізуючий ефект.

За умови хронічного впливу карбендазиму на організм щурів упродовж 104-тижневої експозиції не спостерігалось чіткої залежності “доза-час-ефект” як з боку клітин червоної, так і білої крові. Виявлені морфологічні зміни в еритроцитах, а саме анізоцитоз, акантоцитоз і поліхромазія, були свідченням слабого анемізуючого ефекту, що мав прихований характер.

Зниження кількості базофілів (до 100 %), еозинофілів (на 60 - 90 %), паличкоядерних нейтрофілів (до 100 %) в окремі терміни дослідження, а також наявність макрофагів і морфологічних змін низки клітин білої крові (лімфоцити, нейтрофіли, моноцити) в периферичній крові можуть відображати порушення імунного статусу та, відповідно, пригнічення протипухлинного захисту організму.

У чисельних цитогенетичних дослідженнях з вивчення впливу карбендазиму на генетичний апарат проліферуючих клітин (еритроцити, лімфоцити, ооцити, епітелій кишечника, сперматиди) *in vitro* й *in vivo* було встановлене збільшення кількості випадків порушення мітозу й анеуплоїдій.

Карбендазим *in vivo* не спричиняв генних мутацій або структурних хромосомних аберацій. Було показано, що виявлені цитогенетичні ефекти є пороговими [82, 129, 130, 193]. Дані щодо механізму анеугенного ефекту дозволяють визначити недіючу дозу. Порогову концентрацію такого ефекту в експериментах *in vitro* було встановлено в діапазоні доз 0,2 - 0,6 мкг/мл, *in vivo* – 50 мг/кг маси тіла [193].

Результати, отримані в проведеному хронічному експерименті на щурах, свідчили про розвиток переважно дисгормональних пухлин. Тому був досліджений імовірний епігенетичний механізм розвитку виявлених пухлин в умовах спеціального експерименту з виявлення ендокринних дизрапторів за протоколом US EPA [166]. Дослідження було проведене на ювенільних щурах-самцях, які отримували карбендазим у дозах 10 і 75 мг/кг щоденно впродовж 30 діб.

У тварин за дії карбендазиму в дозі 10 мг/кг змін маси тіла, приросту маси тіла, абсолютної та відносної маси внутрішніх органів не встановлено. Було виявлене недостовірне збільшення абсолютної маси гіпофізу та сім'яних пухирців (на 13 % і 12 %), LABC (на 9 %), печінки, щитоподібної та надниркових залоз (на 4-5 %), а також зниження маси передміхурової залози (на 12 %).

У щурів уведення карбендазиму в дозі 75 мг/кг спричиняло статистично значуще збільшення абсолютної маси гіпофізу (на 49 %), надниркових залоз (на 9 %), епідидимісів (на 17/19 %), а також зниження маси сім'яників (на 28/30 %). Також спостерігалось зменшення абсолютної маси передміхурової залози (на 11 %), сім'яних пухирців і LABC (на 8 %), печінки, щитоподібної залози та нирок (на 5 %), але статистично недостовірне. Статистично значуще збільшувалася відносна маса гіпофізу (на 62 %) та надниркових залоз (на 19 %).

Гістоморфологічні та морфофункціональні зміни були діагностовані в епідидимісах і сім'яниках щурів за дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг: в одних каналцях епідидимісів візуально спостерігалось зменшення кількості

сперматогенної субстанції аж до їх запусіння, в інших – клітинний детрит; наявність дегенеративно-деструктивних змін епітелію. У сім'яниках були відзначені десквамація сперматогенних клітин, зменшення рядності, атрофія та некроз епітелію звивистих каналців. У тварин, які отримували 10 мг/кг карбендазиму, в контрольній групі подібних порушень виявлено не було.

Отже, дозозалежні зміни за дії карбендазиму були встановлені в гіпофізі, надниркових залозах, епідидимісах і сім'яниках.

Відомо, що карбендазим як репродуктивний токсикант насамперед впливає на сперматогенез [86, 87, 194].

Отримані в дослідженні результати підтверджують, що вплив карбендазиму в дозі 75 мг/кг спричиняє порушення гомеостазу андрогенів, а саме виявлені деструктивно-атрофічні зміни в сім'яниках стимулюють синтез гормонів у надниркових залозах за умови активації гіпофізу. Подібний алгоритм підтверджується іншими дослідниками в проведених експериментах на дорослих тваринах. У разі кастрації щурів і зниження продукції тестостерону в сім'яниках відбуваються зростання секреції ФСГ, ЛГ, пролактину, збільшення маси надниркових залоз і підвищення синтезу адренокортикостероїдів. Введення щурам андрогенів призводить до нормалізації вищезазначених змін [167].

Досліджень з вивчення впливу карбендазиму на ендокринну систему на моделі “пубертатного розвитку” щурів-самців у доступній літературі не виявлено, проте присутні роботи щодо вивчення репродуктивної токсичності цієї речовини у вагітних самиць, а надалі в новонароджених самців. Вплив карбендазиму в дозах 6,25, 12,5 і 25 мг/кг на самиць і новонароджених самців упродовж 56 діб не призводив до змін маси сім'яників, епідидимісів, сім'яних пухирців і LABS [195].

Автори інших досліджень зазначають, що вплив карбендазиму на організм як ювенільних, так і статевозрілих щурів у дозах до 25 мг/кг в умовах субхронічного експерименту не діяв на патоморфологічні та сперматологічні показники: тривалість рухової активності сперматозоїдів,

кількість рухливих сперматозоїдів, загальну кількість, а також число патологічно змінених форм статевих клітин; масу сім'яників, епідидимісів, сім'яних пухирців і LABC [76, 196]. У високих дозах (від 300 мг/кг маси тіла) було встановлене значне зниження маси сім'яників, гістоморфологічно виявлене пошкодження сім'яників, надниркових, щитоподібної та паращитоподібної залоз [76].

У тесті Гершбергера на кастрованих щурах Wistar карбендазим у дозах 0, 20, 200 мг/кг маси тіла статистично достовірних змін маси андроген-залежних органів не спричиняв [197]. Ці дані підтверджують, що виявлена в проведених у дослідженні експериментах дозозалежна зміна маси гіпофізу та надниркових залоз пов'язана саме з пошкодженням сім'яників і порушенням сперматогенезу.

Оскільки мішенню токсичної дії карбендазиму є сім'яники, змінюється рівень тестостерону та, відповідно, інших гормонів, що регулюють статеву функцію. Зниження тестостерону включає напрацювання гонадотропними клітинами аденогіпофізу ФСГ та ЛГ. Збільшення концентрації ЛГ стимулює проліферацію клітин Лейдига, що може призвести до утворення пухлин [198].

ФСГ впливає на клітини Сертолі, які зі свого боку стимулюють процес гаметогенезу, активуючи послідовну трансформацію сперматогоній у сперматоцити. ЛГ стимулює клітини Лейдига до синтезу тестостерону, що відповідає за дозрівання сперматозоїдів. Механізм, що діє за принципом зворотного зв'язку, підтримує певний гомеостаз цих і пов'язаних з ними інших гормонів у організмі. Перманентне зниження синтезу тестостерону буде призводити до активації гіпофізу, надниркових залоз і, відповідно, проліферації клітин Лейдига, що й було виявлено в проведених експериментах. Згідно з даними літератури, була показана кореляція між зменшенням маси сім'яників і концентрацією тестостерону в сироватці крові. У субхронічному експерименті за дії карбендазиму в дозах 0, 150, 300, 600 мг/кг рівень загального тестостерону в сироватці крові тварин, які

отримували максимальну та середню дози речовини, знижувався [199]. Водночас в інших подібних дослідженнях [75, 76] змін рівня тестостерону в сироватці крові щурів при введенні карбендазиму в дозах 200 та 400 мг/кг не спостерігалось, проте збільшувалася концентрація тестостерон-зв'язуючих білків. Карбендазим у дозах 0, 20, 100 та 200 мг/кг не впливав на зміну концентрації тестостерону як у сироватці крові, так і в тканині тестикул [197]. У зазначеному дослідженні також не було встановлено змін концентрації ФСГ в сироватці крові. Рівень ЛГ був зниженим за дії дози 200 мг/кг.

В іншій роботі в субхронічному експерименті в щурів-самців було виявлене дозозалежне збільшення ФСГ та ЛГ під впливом карбендазиму в дозах 0, 50, 100, 200 та 400 мг/кг [66]. Водночас рівні пролактину та тіреостимулюючого гормону залишалися незмінними. Автори зауважили, що зміни ФСГ не пов'язані з посиленням синтезу тестостерону, що є свідченням порушення сигнального зв'язку з клітинами Сертолі.

Зниження маси сім'яників, концентрації тестостерону й естрадіолу в сироватці крові при введенні карбендазиму в дозі 25 мг/кг маси тіла тварин протягом 48 діб статевозрілим самцям-щурам Wistar було зазначене в роботі S. Rajeswary та співавт. [70]. Водночас не було встановлено впливу на масу тіла щурів, концентрацію ЛГ та пролактину.

На відміну від вищенаведених результатів, інші автори отримали, що за умови внутрішньошлункового введення карбендазиму щурам-самцям упродовж 7 днів у дозах 0, 6,25, 12,5, 25, 50 і 100 мг/кг відбувалося дозозалежне збільшення концентрації тестостерону та ФСГ в сироватці крові [200]. Антагоніст карбендазиму флутамід при подібному введенні спричиняв аналогічний ефект, який дослідники пояснити не змогли.

Підсумовуючи суперечливі дані вищезазначених праць, можна дійти висновку, що зміни рівнів тестостерону, ФСГ та ЛГ в сироватці крові були обумовлені впливом карбендазиму на сім'яники. У кастрованих тварин таких змін не спостерігалось. Також за дії карбендазиму не було виявлено змін

рівнів пролактину, тіреостимулюючого й адренокортикотропного гормонів, гормона росту та тироксину.

Отже, дія карбендазиму на ендокринну систему реалізується через пошкодження структури сім'яників, наслідком чого є порушення стероїдогенезу, синтезу та транспорту тестостерону й інших гормонів. Проте дозові рівні карбендазиму, при яких концентрація тестостерону зменшується, значно різняться. Оскільки зниження концентрації тестостерону в крові запускає процес напрацювання ЛГ, що стимулює проліферацію клітин Лейдига, в проведеному дослідженні були проаналізовані передпухлинні та пухлинні стани в органах і тканинах щурів в умовах хронічного експерименту. Було виявлене збільшення випадків проліферативних процесів – сумарної кількості лейдигом та осередкової лейдигоклітинної проліферації у тварин, які отримували карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг, але в дозі 75 мг/кг їх було менше. Тим часом кількість деструктивних процесів і атрофія сім'яників значно зростали в дозі 75 мг/кг, що підтверджувало нашу гіпотезу відносно пригнічення проліферації клітин максимальною дозою.

В основі цитотоксичної дії карбендазиму на сім'яники лежить порушення цілісності цитоскелета клітин Сертолі та їхніх взаємовідносин зі сперматогенними клітинами незалежно від механізму їх виникнення. Наслідком такого порушення є відторгнення та некроз цих клітин [201]. На культурі клітин був вивчений вплив карбендазиму на проліферацію клітин Сертолі й експресію в них білків цитоскелета – віментину, α - та β -тубуліну [202]. Порушення цих процесів починає проявлятися в досить низьких концентраціях 0,1 і 1 мкг/мл, проте статистично достовірний стійкий ефект (31 % і 34,87 %) спостерігається у вищих концентраціях (10 і 100 мкг/мл). Інтерстиціальні клітини Лейдига також є мішенню токсичної дії карбендазиму [194, 198, 203]. Показано, що за дії карбендазиму в дозі 25 мг/кг упродовж 7 тижнів на тлі зниження маси сім'яників і концентрації тестостерону в сироватці крові щурів-самців Wistar у клітинах Лейдига відбувалося зниження активності ключових ферментів біосинтезу статевих

гормонів 3- β -гідроксистероїддегідрогенази, 17- β -гідроксистероїддегідрогенази, а також ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази, гамма-глутамілтрансферази, глюкоза-6- фосфатдегідрогенази) [70]. У клітинах Лейдига значно зменшувався вміст антиоксидантів – α -токоферолу, аскорбінової кислоти, відновленого глутатіону, β -каротину. Ці зміни призводили до розвитку окисного стресу, про що свідчило збільшення інтенсивності перекисного окислення ліпідів і підвищення концентрації активних форм кисню. Після припинення введення карбендазиму вищезазначені показники були подібні до контрольних [70, 194, 203].

Отже, оксидативний стрес, а також пригнічення стероїдогенезу, що призводить до зниження синтезу тестостерону й естрадіолу, можуть бути ключовою ланкою онкогенезу в сім'яниках. Слід вказати на видоспецифічність гормональної регуляції лейдигоклітинної проліферації в щурів [198]. Чутливість клітин Лейдига щурів до проліферативних стимулів у вигляді змін концентрацій ЛГ порівняно з клітинами людини значно вища через десятикратне перевищення його рецепторів у цих клітинах.

Пухлини щитоподібної залози, як і лейдигоми, є одним з розповсюджених типів новоутворень щурів Wistar [186-189]. Їх частота у тварин різних розплідників відрізняється та залежить від умов утримання, їжі тощо. Механізм утворення пухлин щитоподібної залози щурів складається з декількох ланок. Основною є стимуляція проліферації фолікулярного епітелію тиреотропним гормоном, синтез якого збільшується у відповідь на зниження концентрації гормонів щитоподібної залози [204]. Згідно з вищенаведеними результатами досліджень, підвищення рівня тиреотропного гормону в крові тварин, які отримували карбендазим у субхронічних експериментах, не виявлено [81]. Не було встановлене зменшення концентрації тироксину, проте в середній дозі (300 мг/кг) відмічалось збільшення концентрації трийодтироніну. Функція щитоподібної залози опосередковано пов'язана з балансом андрогенів [205, 206]. Це може

свідчити про нестабільний рівень цих гормонів у крові, баланс яких підтримується через функціонування осі гіпоталамус-гіпофіз-(гонади, щитоподібна залоза, надниркові залози) [205]. У проведених дослідженнях на ювенільних щурах при вивченні впливу карбендазиму на функцію щитоподібної залози не було встановлено змін показників. Абсолютна та відносна маса щитоподібної залози знаходилася в межах фізіологічних коливань $\pm 4\%$, гістоморфологічних змін виявлено не було. Водночас інший тиреотоксикант у зазначеному тесті давав позитивний результат [207].

У проведеному хронічному експерименті на щурах як через 52, так і через 104 тижні експозиції карбендазимом також не було виявлено збільшення випадків гіпертрофії та гіперплазії щитоподібної залози.

Визначальним у механізмі розвитку пухлин щитоподібної залози є порушення функції печінки та, відповідно, метаболізму гормонів T_3 та T_4 . Проте отримані в проведеному хронічному експерименті результати свідчать лише про слабкий гепатотоксичний ефект. В експерименті з вивчення індукції ендокринних порушень на ювенільних щурах також не було встановлено суттєвих змін щодо абсолютної та відносної маси печінки тварин. Згідно з літературними даними, карбендазим не впливає на функцію щитоподібної залози, з чим можна було б пов'язати збільшення частоти пухлин даної локалізації.

Зростання частоти новоутворень гіпофізу та молочної залози в самиць перебуває в межах коливань спонтанних пухлин щурів Wistar [186-189]. Частота розвитку аденом гіпофізу в самиць може становити до 60 %, фіброаденом молочної залози – 34 % [189]. Аналізуючи результати зазначених робіт, можна погодитися з авторами, що щури Wistar є чутливою моделлю для вивчення впливу хімічних речовин на спонтанний онкогенез в органах ендокринної системи. Дослідники запропонували механізм розвитку цих пухлин через вплив на вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади внаслідок опосередкованої неспецифічної дії відповідних чинників.

Загальне збільшення частоти пухлин в ендокринних органах може бути

пов'язане з системним впливом карбендазиму на органи ендокринної системи через механізм блокування збірки мікротрубочок цитоскелета та відповідні цитодинамічні зміни. Проте в літературі такі дані вкрай обмежені [208, 209].

Під час дослідження подібних за механізмом дії речовин було встановлено, що блокування утворення мікротрубочок призводить до порушення функціонування клітинних рецепторів і трансмембранних сигнальних систем клітин, а також мембранозв'язуючих ферментних систем. Водночас мікротрубочки, з одного боку, визначають функціональну активність гормональних сигнальних систем, з іншого, – самі є мішенями регуляторної дії гормонів, що активують ці системи [210-213].

З одного боку, дія колхіцину підсилює стимуляцію гормонами аденілатциклази в надниркових залозах, клітинах Лейдига, яєчниках, лейкоцитах, з іншого, – пригнічує стимуляцію аденілатциклази адренотропним гормоном і ангіотензином у надниркових залозах [212].

Наведене свідчить про різні молекулярні механізми впливу полімеризації-деполімеризації тубуліну мікротрубочок, пов'язаних з Gs-білками сигнальної системи. Вивчаючи дію 55 пестицидів (потенційних ендокринних дизрапторів) на активність ароматази в культурі клітин людини лінії KGN, показали, що лише беноміл і його метаболіт карбендазим спричиняли експресію матричної рибонуклеїнової кислоти цього ферменту. Ефект не реалізувався через циклічний аденозинмонофосфат-залежну сигнальну систему та був обумовлений блокуванням збірки мікротрубочок і зміною стану цитоскелета [72].

Під час вивчення прямої взаємодії карбендазиму з рецепторами естрогенів hER α , hER β і андрогенів hAR в умовах *in vitro* в тесті Reporter Gene Assays на клітинах яєчника китайського хом'ячка була показана відсутність ефекту [66, 214, 215]. Водночас існують дані, що карбендазим індукуює експресію генів і синтез андрогенних рецепторів та взаємодіє з ними

у сім'яниках та, меншою мірою, простаті й епідидимісах щурів-самців [68, 200]. Статистично значущий ефект спостерігався за дії карбендазиму в дозі 6,25 мг/кг. Антиандроген флутамід під час введення разом з карбендазимом призводив до дозозалежного зниження ефекту.

Отже, збільшення загальної частоти дисгормональних пухлин у хронічному експерименті з вивчення канцерогенності карбендазиму на щурах було виявлене в діапазоні доз, які за вищенаведеними літературними даними спричиняють порушення функції ендокринної системи.

Слід зауважити, що цитотоксична дія карбендазиму на проліферуючі клітини, зокрема пухлинні, що утворюються в результаті спонтанного онкогенезу, зі збільшенням дози зростає. Саме цим можна пояснити відсутність класичної залежності “доза-ефект”. У проведеному експерименті онкогенний ефект проявлявся в усіх дозах порівняно з контролем, водночас приблизно на одному рівні, до того ж відрізнявся за локалізацією пухлин: при дії карбендазиму в самиць у максимальній дозі спостерігалось статистично значуще зростання частоти пухлин гіпофізу, при мінімальній і середній дозах збільшувалася частота пухлин щитоподібної та молочної залоз. Подібний парадоксальний ефект був виявлений іншими авторами при випробуванні на канцерогенність на щурах вінбластин сульфату, схожого на карбендазим за механізмом дії речовини: в максимально витривалій дозі ефект був незначним, а при зменшенні її на 50 % частота пухлин зростала в 1,5-2 рази [216].

Оскільки карбендазим вважається гепатоканцерогеном за результатами досліджень на мишах кількох ліній [33], але без прямих доказів генотоксичності в органі-мішені [13], були вивчені його промоторні властивості на моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія”. Дана експериментальна модель була обрана також тому, що ініціація гепатоцитів проводилася НДЕА – одним з канцерогенів, що можуть утворюватися з пестицидів і азотних добрив та найчастіше зустрічатися у вигляді залишків у різних продуктах харчування [217, 218].

При гепатоканцерогенезі в трансформованих гепатоцитах експресуються білки ембріонального фенотипу, зокрема ГГТ, альфа-фетопротейн, фетальний ізоzim піруваткінази (К-тип III) та альдолаза В [184]. Спонтанно в печінці існує невелика популяція клітин, що задіяні в регенераторних процесах, проте за ініціації канцерогеном відбувається їх проліферація. Впродовж промоторної стадії канцерогенезу під впливом хімічних речовин проходять подальше розмноження та селекція клонів цих клітин, що призводить до появи стовбурових клітин майбутніх пухлин. Наявність ГГТ на поверхні клітини дає можливість підвищити рівень внутрішньоклітинного глутатіону, що забезпечує метаболізм і детоксикацію ксенобіотиків, підвищує стійкість клітин до цитотоксичних факторів. Створюються умови для проліферації та селекції клонів трансформованих гепатоцитів. Найбільш стійкі поліпотентні гепатоцити, що вижили, утворюють стовбурові клітини пухлин у вигляді локальних проліфератів. Кількість і розміри цих локусів є основними критеріями оцінки промоторної активності досліджуваних факторів [168, 184, 219-221]. На основі вказаного була запропонована низка тестів для вивчення промоторної активності ксенобіотиків, зокрема модель “НДЕА-гепатектомія” за протоколом N. Ito, що рекомендована IARC в якості середньострокового тесту з визначення гепатоканцерогенів [168].

За допомогою цієї моделі в проведеному дослідженні була вивчена промоторна активність карбендазиму в щурів-самців при його введенні в дозах 0, 25, 75 і 300 мг/кг. У тварин, які отримували карбендазим у середній дозі, статистично достовірно збільшувалася кількість ГГТ-позитивних вузликів, була виявлена тенденція до зростання площі вузликів, що свідчило про слабкий промоторний ефект. У мінімальній і максимальній дозах у печінці тварин не було встановлено впливу на проліферацію гепатоцитів. Фенобарбітал, що був використаний в експерименті в якості позитивного контролю, спричиняв достовірне збільшення вказаних показників.

Онкогенний потенціал карбендазиму може бути реалізованим через

декілька механізмів: як промотор трансформованих гепатоцитів та як інгібітор проліферації клітин через блокування мітозу й індукцію апоптозу. Отримані під час дослідження “парадоксальні” результати можна пояснити тим, що карбендазим у високій дозі (300 мг/кг) проявляє цитотоксичну дію й індукує апоптоз, у середній (75 мг/кг) працює як промотор, у мінімальній (25 мг/кг) результати, отримані на моделі “НДЕА-гепатектомія”, не відрізняються від негативного контролю.

Відповідно до сучасних уявлень, викладених експертами IARC щодо встановлення канцерогенної небезпеки для людини за результатами досліджень на експериментальних тваринах [150, 191], достатнім доказом канцерогенності вважається встановлення причинно-наслідкового зв'язку між впливом агента та раком. Висновок ґрунтується на підвищенні частоти злоякісних пухлин або їх комбінації з доброякісними новоутвореннями на двох видах тварин.

Отримані під час дослідження результати щодо ідентифікації канцерогенності карбендазиму в хронічному експерименті на щурах не можуть однозначно вважатися достатніми доказами канцерогенності для людини згідно з цими вимогами, оскільки виявлені пухлини переважно були доброякісними. Їхні локалізація та гістоморфологічний тип були характерними для спонтанного онкогенезу щурів Wistar. Можливо, саме відсутність чіткої дозової залежності частоти пухлин не дозволила попереднім дослідникам визначити онкогенний ефект карбендазиму в щурів. Тому, ймовірно, не взяли до уваги збільшення частоти пухлин у мінімальній і середній дозах. Під час вивчення канцерогенності беномілу, близького аналога, основним метаболітом якого є карбендазим, на щурах найбільша частота пухлин була виявлена в гіпофізі, молочній і надниркових залозах, проте автори не встановили різниці між групами [142]. На жаль, відсутність у літературі кількісних показників результатів цих досліджень не дозволяє їх детально проаналізувати.

А втім, статистично достовірне збільшення частоти лейдигом у щурів-

самців і частоти пухлин щитоподібної та молочної залоз у щурів-самиць у дозах 5 і 25 мг/кг, відсутність цих ефектів у дозі 75 мг/кг вказують на можливість модуляції карбендазимом спонтанного онкогенезу через опосередкований механізм впливу на функцію ендокринної системи. На наш погляд, це може здійснюватися через кілька механізмів, зокрема в самців – через пошкодження сім'яників, зниження синтезу тестостерону та відповідне підвищення активності аденогіпофізу, що стимулює функціональну активність органів осі гіпофіз-надниркові залози, гіпофіз-гонади, компенсаторну проліферацію клітин Лейдига та, відповідно, утворення пухлин. Підвищення дози карбендазиму збільшує його антипроліферативну дію, внаслідок чого сповільнюється утворення пухлин у сім'яниках. Це підтверджується також даними інших дослідників: у максимальній дозі беномілу, головним метаболітом якого є карбендазим, у хронічних експериментах у самців-мишей онкогенний ефект не виявлено [142].

За іншим механізмом через порушення динамічності цитоскелета клітин можуть розвиватися інші пухлини ендокринної системи. При таких порушеннях змінюється взаємодія гормонів з рецептором і транспортування їхніх комплексів у клітинах, що призводить до змін у роботі сигнальних систем і гормонального гомеостазу, наслідком чого може бути напруження осі гіпофіз-надниркові залози, гіпофіз-гонади [209-212] й, як наслідок, стимуляція функціональної активності органів, зокрема гіпофізу. Через такий механізм за досить низьких концентрацій беномілу та карбендазиму (10^{-5} М) відбувається індукція ароматази (CYP19) [72], що є лімітуючим ферментом у реакціях перетворення андрогенів у естрогени. Гіперестрогенізація організму може призвести до утворення пухлин молочної залози [222, 223].

Ключовою ланкою механізму утворення пухлин щитоподібної залози в щурів є стимуляція секреції тиреотропного гормону гіпофізом за системою негативного зворотного зв'язку, що відбувається через зниження концентрації тироксину або трийодтироніну. Враховуючи, що період напіврозпаду цих гормонів у щурів значно коротший (12 годин), ніж у

людини (5-10 діб), даний механізм є видоспецифічним для щурів [224]. Відсутність збільшення кількості випадків гіпертрофії та гіперплазії щитоподібної залози в щурів, які отримували карбендазиму у проведеному дослідженні, і літературних даних про зростання тиреотропного гормону в крові щурів під впливом карбендазиму, не дозволяє однозначно зв'язати виявлене підвищення кількості пухлин з дією досліджуваної речовини. Водночас слід відзначити, що більшість пухлин даної локалізації була виявлена на останньому етапі експерименту при некропсії тварин.

Про відсутність ініціюючого механізму розвитку виявлених у низьких дозах пухлин свідчать літературні дані досліджень, в яких була встановлена пороговість генотоксичної дії карбендазиму на рівні 50 мг/кг. Проте повністю виключати цей механізм неможливо через дані, отримані в дослідженнях *in vitro*, де була показана генотоксична дія карбендазиму на культурах різних тканин людини та її пороговість на рівні доз 0,2-0,6 мкг/мл [193].

Латентний період розвитку пухлин у піддослідних і контрольній групах суттєво не відрізнявся. Час виявлення першої пухлини та тривалість середнього латентного періоду розвитку пухлини були співставними. Коефіцієнт множинності в піддослідних і контрольній групах також статистично не відрізнявся. Не було встановлено даних, що б свідчили про подальшу малігнізацію виявлених доброякісних пухлин. Пухлина з метастазами була діагностована лише в 1 випадку.

Існує думка, що малігнізація лейדיгом і фіброаденом молочної залози в щурів практично не відбувається. Вірогідність реалізації відомих механізмів їх утворення в людини низька, але ці ефекти мають токсикологічне значення для людини як показники ендокриндизрапторної дії [198, 225-228].

Отже, встановлене під час дослідження підвищення частоти пухлин в щурів може трактуватися як обмежені докази канцерогенності карбендазиму. Ці ефекти є підтвердженням ендокриндизрапторної дії карбендазиму, наслідком якої є модуляція спонтанного онкогенезу.

У мишей лінії СВА онкогенний ефект виявлений не був, що може бути наслідком біологічної особливості цих тварин. Згідно з літературними даними, гепатоканцерогенний ефект був встановлений на мишах ліній CD-1 і Swiss, в яких спостерігався високий спонтанний рівень гепатом, водночас у мишей лінії NMRKf з низьким рівнем гепатом онкогенний ефект був відсутнім [192, 193]. Недіючий рівень за онкогенним ефектом NOEL у мишей за отриманими та літературними даними можна встановити на рівні 45 мг/кг, ефективну дозу – >75 мг/кг. Експерти ЕРА класифікували канцерогенний ефект на мишах як обмежені докази канцерогенності, група С і визначили коефіцієнт онкогенного потенціалу $SF=0,00239$. Виявлений ефект був обумовлений модуляцією карбендазимою спонтанного онкогенезу. Це узгоджується з даними, отриманими під час вивчення промоторної активності карбендазиму. На моделі гепатоканцерогенезу “НДЕА-гепатектомія” були встановлені слабкий промоторний ефект карбендазиму в дозі 75 мг/кг і його відсутність у дозі 25 мг/кг.

Дані щодо генотоксичного ефекту, отримані під час вивчення впливу карбендазиму *in vitro* на рівні малих доз [128, 193], свідчать про його генотоксичність для тварин і людей. Але ці ефекти не реалізуються *in vivo* при його хронічному надходженні в організм тварин, на наш погляд, через супутню цитотоксичність.

Отже, карбендазим в експериментах *in vivo* на тваринах проявив слабкий онкогенний ефект з дискусійною релевантністю механізмів розвитку пухлин для людини та свідчить про порушення функції ендокринної системи, механізм якої притаманний людині. Підтвердженням цього також є репродуктивна токсичність карбендазиму та можливість індукції ароматази [71, 72]. NOEL за результатами проведених досліджень не встановлена, але, враховуючи вищенаведену обмеженість доказів онкогенного ефекту, можна рекомендувати NOAEL 5 мг/кг. Добова допустима доза в Україні затверджена на рівні 0,01 мг/кг, отже, враховує всі виявлені в дослідженні ефекти карбендазиму.

Результати вивчення канцерогенності карбендазиму в хронічних експериментах можуть бути використані як еталон (прототип) при ідентифікації канцерогенної небезпеки інших генериків цієї речовини. Відпрацьовані під час виконання дослідження методики з визначення порушень функції ендокринної системи в самців і промоторної дії гепатоканцерогенів пропонуються для використання в низці альтернативних тестів з ідентифікації канцерогенності пестицидів-генериків з гормональним і промоторним механізмом дії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на підставі експериментальних досліджень ідентифікована канцерогенність генеричного карбендазиму, визначені гістоморфологічний спектр пухлин, особливості канцерогенного потенціалу у тварин, видові відмінності, з'ясовані можливі механізми канцерогенної дії у щурів шляхом впливу на ендокринну систему та промоцію, надана характеристика морфофункціональних і гістоморфологічних 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 у щурів-самиць статистично достовірне збільшення частоти пухлин щитоподібної залози за дії дози 5 мг/кг (на 26,4 %) порівняно з контролем (13,6 %), молочної залози за дії доз 5 і 25 мг/кг (на 21,7 % і 25 % відповідно) порівняно з контролем (8,5 %), гіпофізу за дії дози 75 мг/кг (на 17,9 %) порівняно з контролем (5,5 %); у щурів-самців зростання частоти лейдигоклітинних пухлин за дії дози 25 мг/кг (на 20 %) порівняно з контролем (5,9 %). У самців спостерігалися односпрямовані 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 гострої інтоксикації в дозі 750 мг/кг обмежується цитотоксичністю, про що свідчать зменшення кількості формених елементів крові, морфологічні зміни лейкоцитів та 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 самців і самиць мишей лінії СВА впродовж 78-тижневої експозиції не призводить до змін частоти пухлин і латентного періоду, отже, карбендазим в умовах проведеного експерименту не проявляє канцерогенного ефекту у мишей.
4. Виявлений вплив карбендазиму в умовах хронічного експерименту на ендокринну систему дорослих щурів Wistar за критеріями частоти пухлин щитоподібної та молочної залоз, гіпофізу та сім'яників підтверджений пошкоджуючою дією речовини на морфофункціональні і гістоморфологічні 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 та 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 атрофічних і дегенеративних змін у сім'яниках і епідидимісах. 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 $0,29/\text{см}^2$ в контролі) й є свідченням промоторної дії речовини в цій дозі. Виявлений ефект свідчить про можливість реалізації онкогенного потенціалу карбендазиму через механізм промоції.
7. Відпрацьовані та впроваджені 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. WHO. Ukraine – Global Cancer Observatory [Internet]. 2019 May [cited 2020 Jul 20]. URL: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/804-ukraine-fact-sheets.pdf>.
2. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 2012; 484 (7393):186-94.
3. Atwood D, Paisley-Jones C. Pesticides industry sales and usage: 2008-2012 Market Estimates [Internet]. 2017 [cited 2020 Jul 20]. URL: https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf.
4. Ashrafi AM, Dordevic J, Guzsvsny V, Svancara I, Trtic-Petrovic T, Purenovic M, et al. Trace determination of carbendazim fungicide using adsorptive stripping voltammetry with a carbon paste electrode containing tricresyl phosphate. *Int J Electrochem Sci*. 2012;7:9717-31.
5. Pelaez V, Rodrigues da Silva L, Borges Araujo E. Regulation of pesticides: A comparative analysis. *Sci Public Policy*. 2013 Oct; 40(5):644-56.
6. Directive 2009/128/EC of the European parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides (Text with EEA relevance) [Internet]. 2009 Nov 24 [cited 2020 Jul 20]. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0128>.
7. Salahuddin, Shaharyar M, Mazumder A. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arab J Chem*. 2017 Feb;10(Suppl 1):S157-73.
8. Халиков СС, Архипов ИА, Варламова АИ, Халиков МС, Чистяченко ЮС, Душкин АВ. Экологически безопасные антигельминтные препараты в ряду бензимидазолов: синтез, свойства, применение. Юг России: экология, развитие. 2016;11(1):178-92.
9. Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. The evolution of fungicide resistance. *Adv*

Appl Microbiol. 2015;90:29-92.

10. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. Київ: Юніверс Медіа; 2020. 893 с.

11. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Carbendazim: review findings report [Internet]. 2012 [cited 2020 Jan 20]. URL: <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14541-carbendazim-review-findings-report.pdf>.

12. PAN Europe. Factsheet carbendazim [Internet]. [cited 2020 Jan 20]. URL: <https://www.pan-europe.info/old/Resources/Factsheets/PANE%20-%202014%20-%20Factsheet%20carbendazim%202014.pdf>.

13. McCarroll NE, Protzel A, Ioannou Y, Frank Stack HF, Jackson MA, Waters MD, et al. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. Mutat Res. 2002 Sep;512(1):1-35.

14. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection of the Department of Health and Ageing. Human health risk assessment of carbendazim [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Jan 20]. URL: <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14531-carbendazim-prf-vol2.pdf>.

15. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. EFSA J [Internet]. 2010 [cited 2020 Jan 20];8(5):1598. URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1598>.

16. Summary report of the Standing committee on plants, animals, food and feedheld in Brussels on 09 october 2014 – 10 october 2014 (Section Phytopharmaceuticals – Plant Protection Products – Legislation) [Internet]. [cited 2020 Jan 20]. URL: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/sc_phytopharmaceuticals_sum_2014100910_pppr_en.pdf.

17. PAN international consolidated list of banned pesticides [Internet]. [cited 2020 Jan 20]. URL: <http://pan-international.org/pan-international-consolidated-list-of->

[banned-pesticides/](#).

18. University of Hertfordshire. Carbendazim (Ref: BAS 346F) [Internet]. [cited 2020 Apr 23]. URL: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/116.htm>.
19. Об утверждении Списка пестицидов (ядохимикатов), разрешенных к применению на территории Республики Казахстан на 2013-2022 годы: приказ Председателя Комитета государственной инспекции в агропромышленном комплексе Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан № 143 от 27.12.2012 г. [Интернет]. [цитировано 2020 Янв 20]. URL: https://online.zakon.kz/Document/?doc_id=31653900.
20. Государственный реестр средств защиты растений и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь 2017 год [Интернет]. [цитировано 2020 Янв 20]. URL: https://www.ggiskzr.by/gosudarstvennyj_rees/.
21. Cycon M, Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*. 2017 Apr;172:52-71.
22. Александрова ЛГ, Демченко ВФ, Кірсенко ВВ, Ледовских НГ, Макаrchук ЯВ, Заєць ЕР, та ін. Дослідження забруднення довкілля після застосування сумішевих пестицидних препаратів. В: Зб. тез доп. наук-практ. конф. (до 120-річчя з дня народж. акад. О.М. Марзєєва) Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України; 2003 Квіт 24-25; Київ. Київ; 2003;(5). с. 83-4.
23. Panda J, Kanjilal T, Das S. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. *Biotechnol Res Innov*. 2018 Jan-Dec;2(1):45-57.
24. Ellis SR, Hodson ME, Wege P. The soil-dwelling earthworm *Allolobophora chlorotica* modifies its burrowing behaviour in response to carbendazim applications. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2010 Sep;73(6):1424-8.
25. Murray KE, Thomas SM, Bodour AA. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ Pollut*. 2010 Dec;158(12):3462-71.

26. Kupper T, Plagellat C, Brandli RC, de Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J. Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water Res.* 2006 Aug;40(14):2603-12.
27. Boudina A, Emmelin C, Baaliouamer A, Grenier-Loustalot MF, Chovelon JM. Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution. *Chemosphere.* 2003 Feb;50(5):649-55.
28. Mohapatra S, S L. Residue level and dissipation of carbendazim in/on pomegranate fruits and soil. *Environ Monit Assess.* 2016 Jul;188(7):406.
29. Garcia PC, Ruiz JM, Rivero RM, Lopez-Lefebvre LR, Sanchez E, Romero L. Is the application of carbendazim harmful to healthy plants? Evidence of weak phytotoxicity in tobacco. *J Agric Food Chem.* 2002 Jan 16;50(2):279-83.
30. Sangeetha R. Activity of superoxide dismutase and catalase in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) in response to carbendazim. *Indian J Pharm Sci.* 2010 Jan;72(1):116-8.
31. Siddiqui MF, Bano B. Exposure of carbendazim induces structural and functional alteration in garlic phytochemical: An in vitro multi-spectroscopic approach. *Pestic Biochem Physiol.* 2018 Feb;145:66-75.
32. Garcia PC, Rivero RM, Lopez-Lefebvre LR, Sanchez E, Ruiz JM, Romero L. Direct action of the biocide carbendazim on phenolic metabolism in tobacco plants. *J Agric Food Chem.* 2001 Jan;49(1):131-7.
33. WHO. Carbendazim: environmental health criteria 149 [Internet]. Geneva; 1993 [cited 2020 Apr 20]. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm>.
34. Laryea D. Preclinical characterization *in vivo* and *in vitro* of novel agents for cancer chemotherapy: studies on benomyl, carbendazim, cryptolepine and acriflavine [Internet]. 2010 [cited 2020 Apr 20]. URL: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:349313/FULLTEXT02.pdf>.
35. Wei KL, Chen FY, Lin CY, Gao GL, Kao WY, Yeh CH, et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor reduces carbendazim-induced cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Sep 1;306:86-97.

36. Krechniak J, Klosowska B. The fate of ¹⁴C-carbendazim in rat. *Xenobiotica*. 1986 Sep;16(9):809-15.
37. Jia L, Garza M, Wong H, Reimer D, Redelmeier T, Camden JB, et al. Pharmacokinetic comparison of intravenous carbendazim and remote loaded carbendazim liposomes in nude mice. *J Pharm Biomed Anal*. 2002 Apr 1;28(1):65-72.
38. Jia L, Wong H, Wang Y, Garza M, Weitman SD. Carbendazim: disposition, cellular permeability, metabolite identification, and pharmacokinetic comparison with its nanoparticle. *J Pharm Sci*. 2003 Jan;92(1):161-72.
39. Jin Y, Zeng Z, Wu Y, Zhang S, Fu Z. Oral exposure of mice to carbendazim induces hepatic lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis. *Toxicol Sci*. 2015 Sep;147(1):116-26.
40. Muthuviveganandavel V, Muthuraman P, Muthu S, Srikumar K. Toxic effects of carbendazim at low dose levels in male rats. *J Toxicol Sci*. 2008 Feb;33(1):25-30.
41. Mirzaei A, Sepehri S, Sadeghi H, Alamdari A. Protecting impact of Jaft against carbendazim induced biochemical changes in male Wistar rats. *J Med Life*. 2015;8(Spec Iss 3):96-100.
42. Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. 6-Gingerol-Rich Fraction from *Zingiber officinale* Prevents Hematotoxicity and Oxidative Damage in Kidney and Liver of Rats Exposed to Carbendazim. *J Diet Suppl*. 2016;13(4):433-48.
43. Daundkar PS, Rampal S. Evaluation of ameliorative potential of selenium on carbendazim induced oxidative stress in male goats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 Nov;38(3):711-9.
44. Jones OA, Murfitt S, Svendsen C, Turk A, Turk H, Spurgeon DJ, et al. Comparisons of metabolic and physiological changes in rats following short term oral dosing with pesticides commonly found in food. *Food Chem Toxicol*. 2013 Sep;59:438-45.
45. Zhu Y, Liang X, Li Y, Duan Y, Zheng Z, Wang J, et al. F240 of β_2 -Tubulin Explains why *Fusarium graminearum* is Less Sensitive to Carbendazim than *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 2018 Mar;108(3):352-61.
46. Vela-Corcia D, Romero D, de Vicente A, Perez-Garcia A. Analysis of β -

tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Sci Rep*. 2018 May 8;8(1):7161.

47. Zhou Y, Xu J, Zhu Y, Duan Y, Zhou M. Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. *Phytopathology*. 2016 Aug;106(8):807-13.

48. Zhou Y, Zhu Y, Li Y, Duan Y, Zhang R, Zhou M. β 1 Tubulin Rather Than β 2 Tubulin Is the Preferred Binding Target for Carbendazim in *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*. 2016 Sep;106(9):978-85.

49. Qiu J, Huang T, Xu J, Bi C, Chen C, Zhou M. β -Tubulins in *Gibberella zeae*: their characterization and contribution to carbendazim resistance. *Pest Manag Sci*. 2012 Aug;68(8):1191-8.

50. Yenjerla M, Cox C, Wilson L, Jordan MA. Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Feb;328(2):390-8.

51. Selmanoglu G, Barlas N, Songur S, Kockaya EA. Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. *Hum Exp Toxicol*. 2001 Dec;20(12):625-30.

52. Yu G, Liu Y, Xie L, Wang X. Involvement of Sertoli cells in spermatogenic failure induced by carbendazim. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009 Mar;27(2):287-92.

53. Викторов АВ, Юркив ВА. Влияние карбендазима на функционирование купферовских клеток. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2012;154(10):432-4.

54. Council Directive of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances (67/548/EEC) [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31967L0548>.

55. Siddiqui MF, Khan MS, Husain FM, Bano B. Deciphering the binding of carbendazim (fungicide) with human serum albumin: A multi-spectroscopic and

molecular modelling studies. *J Biomol Struct Dyn*. 2019 Jun;37(9):2230-41.

56. Jacobsen H, Ostergaard G, Lam HR, Poulsen ME, Frandsen H, Ladefoged O, et al. Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. *Food Chem Toxicol*. 2004 Aug;42(8):1269-77.

57. Zari TA, Al-Attar AM. Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011 Apr;15(4):413-26.

58. Dikic D, Landeka I, Knezevic F, Mojsovic-Cuic A, Benkovic V, Horvat-Knezevic A, et al. Carbendazim impends hepatic necrosis when combined with imazalil or cypermethrin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 May;110(5):433-40.

59. Janardhan A, Rao AB, Sisodia P. Short-term toxicity of methyl benzimidazole carbamate in dogs. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1988 Nov;41(5):704-11.

60. Кочевенко ОС. Клінічні та патоморфологічні зміни в органах і тканинах щурів під впливом карбендазиму. *Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту вет. медицини та біотехнологій ім. Гжицького*. 2014;16(2 Ч 2):175-9.

61. Dalvi RR. Effect of the fungicide benomyl on xenobiotic metabolism in rats. *Toxicology*. 1992;71(1-2):63-8.

62. Kucera SP, Swann JM, Kennedy JR, Schultz TW. The effects of benomyl and its breakdown products carbendazim and butyl isocyanate on the structure and function of tracheal ciliated cells. *J Environ Sci Health B*. 1995 Nov;30(6):779-99.

63. Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jun;8(6):2265-303.

64. Keane KA, Parker GA, Regan KS, Picut C, Dixon D, Creasy D, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) points to consider: histopathology evaluation of the pubertal development and thyroid function assay (OPPTS 890.1450, OPPTS 890.1500) in rats to screen for endocrine disruptors. *Toxicol Pathol*. 2015 Dec;43(8):1047-63.

65. Yamada T, Sumida K, Saito K, Ueda S, Yabushita S, Sukata T, et al. Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 May 15;205(1):11-30.
66. Gray LE Jr, Ostby J, Linder R, Goldman J, Rehnberg G, Cooper R. Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster. *Fundam Appl Toxicol*. 1990 Aug;15(2):281-97.
67. Goldman JM, Rehnberg GL, Cooper RL, Gray LE Jr, Hein JF, McElroy WK. Effects of the benomyl metabolite, carbendazim, on the hypothalamic-pituitary reproductive axis in the male rat. *Toxicology*. 1989 Jul 17;57(2):173-82.
68. Rama EM, Bortolan S, Vieira ML, Gerardin DC, Moreira EG. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014 Aug;69(3):476-86.
69. Yu G, Guo Q, Xie L, Liu Y, Wang X. Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats. *Toxicol Ind Health*. 2009 Feb;25(1):41-7.
70. Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, et al. Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. *Reprod Toxicol*. 2007 Nov-Dec;24(3-4):371-80.
71. Kawaratani Y, Matsuoka T, Hirata Y, Fukata N, Nagaoka Y, Uesato S. Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 Jan;39(1):292-9.
72. Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, et al. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology*. 2004 Apr;145(4):1860-9.
73. Lu SY, Liao JW, Kuo ML, Wang SC, Hwang JS, Ueng TH. Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2004 Oct 8;67(19):1501-15.

74. Watson M, prepared. Carbendazim [Internet]. [cited 2020 Jan 20]. URL: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr04.htm>.
75. Rehnberg GL, Cooper RL, Goldman JM, Gray LE, Hein JF, McElroy WK. Serum and testicular testosterone and androgen binding protein profiles following subchronic treatment with carbendazim. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1989 Oct;101(1):55-61.
76. Barlas N, Selmanoglu G, Kockaya A, Songur S. Effects of carbendazim on rat thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands and their hormones. *Hum Exp Toxicol*. 2002 Apr;21(4):217-21.
77. Pisani C, Voisin S, Arafah K, Durand P, Perrard MH, Guichaoua MR, et al. *Ex vivo* assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. *ALTEX*. 2016;33(4):393-413.
78. Songur SH, Kockaya EA, Selmanoglu G, Barlas N. Dose-dependent effects of carbendazim on rat thymus. *Cell Biochem Funct*. 2005 Nov-Dec;23(6):457-60.
79. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing: Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 [Internet]. [cited 2020 Jan 20]. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1272>.
80. Petrelli G, Figa-Talamanca I, Lauria L, Mantovani A. Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides. *Environ Health Prev Med*. 2003 Jul;8(3):77-81.
81. Nakai M, Hess RA, Moore BJ, Guttroff RF, Strader LF, Linder RE. Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat. *J Androl*. 1992 Nov-Dec;13(6):507-18.
82. Matsuo F, Nakai M, Nasu T. The fungicide carbendazim induces meiotic micronuclei in the spermatids of the rat testis. *J Vet Med Sci*. 1999 May;61(5):573-6.
83. Carter SD, Hess RA, Laskey JW. The fungicide methyl 2-benzimidazole

carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats. *Biol Reprod*. 1987 Oct;37(3):709-17.

84. Nakai M, Miller MG, Carnes K, Hess RA. Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis. *Tissue Cell*. 2002 Apr;34(2):73-80.

85. Aire TA. Short-term effects of carbendazim on the gross and microscopic features of the testes of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat Embryol (Berl)*. 2005 Aug;210(1):43-9.

86. Adedara IA, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP, Farombi EO. Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 May;35(3):444-53.

87. Шепельская НР, Иванова ЛП, Григоренко ЛИ. Идентификация опасности репродуктивной токсичности восьми образцов пестицида карбендазима. *Громад. здоров'я та проблеми харчування*. 2018;(1):16-31.

88. Chang CC, Hsieh YY, Hsu KH, Tsai HD, Lin WH, Lin CS. Deleterious effects of arsenic, benomyl and carbendazim on human endometrial cell proliferation in vitro. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2010 Dec;49(4):449-54.

89. Perreault SD, Jeffay S, Poss P, Laskey JW. Use of the fungicide carbendazim as a model compound to determine the impact of acute chemical exposure during oocyte maturation and fertilization on pregnancy outcome in the hamster. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992 Jun;114(2):225-31.

90. Jeffay SC, Libbus BL, Barbee RR, Perreault SD. Acute exposure of female hamsters to carbendazim (MBC) during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation. *Reprod Toxicol*. 1996 May-Jun;10(3):183-9.

91. Spencer F, Chi L, Zhu MX. Biochemical characterization of benomyl inhibition on endometrial growth during decidualization in rats. *Adv Exp Med Biol*. 1998;444:163-9.

92. Zhou J, Xiong K, Yang Y, Ye X, Liu J, Li F. Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. *Reprod Toxicol*. 2015

Jan;51:64-71.

93. Halwachs S, Schafer I, Kneuer C, Seibel P, Honscha W. Assessment of ABCG2-mediated transport of pesticides across the rabbit placenta barrier using a novel MDCKII in vitro model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016 Aug 15;305:66-74.
94. Riebeling C, Fischer K, Luch A, Seiler AE. Classification of reproductive toxicants with diverse mechanisms in the embryonic stem cell test. *J Toxicol Sci*. 2015 Dec;40(6):809-15.
95. Minta M, Wilk I, Zmudzki J. Embryotoxicity of carbendazim in rat and hamster micromass cultures. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2004;48(4):481-4.
96. Farag A, Ebrahim H, ElMazoudy R, Kadous E. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2011 Apr;92(2):122-30.
97. Sitarek K. Embryo-lethal and teratogenic effects of carbendazim in rats. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2001;21(5):335-40.
98. Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang PT, et al. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*. 2016 Jan;170:390-9.
99. Upadhyay J, Rana M, Bisht SS, Rana A, Durgapal S, Juyal V. Biomarker responses (serum biochemistry) in pregnant female wistar rats and histopathology of their neonates exposed prenatally to pesticides. *Braz J Pharm Sci*. 2019;55:e18194.
100. Shi T, Burton S, Zhu Y, Wang Y, Xu S, Yu L. Effects of Field-Realistic Concentrations of Carbendazim on Survival and Physiology in Forager Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Sci*. 2018 Jul 1;18(4):6.
101. Colosio C, Corsini E, Barcellini W, Maroni M. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. *Toxicol Lett*. 1999 Sep 5;108(2-3):285-95.
102. Dewailly E, Ayotte P, Bruneau S, Gingras S, Belles-Isles M, Roy R. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ Health Perspect*. 2000 Mar;108(3):205-11.

103. Galloway T, Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*. 2003 Feb-Aug;12(1-4):345-63.
104. Corsini E, Sokooti M, Galli CL, Moretto A, Colosio C. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*. 2013 May 10;307:123-35.
105. Li Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *J Nippon Med Sch*. 2007 Apr;74(2):92-105.
106. Blakley BR, Yole MJ, Brousseau P, Boermans H, Fournier M. Effect of chlorpyrifos on immune function in rats. *Vet Hum Toxicol*. 1999 Jun;41(3):140-4.
107. Dietert RR. Role of developmental immunotoxicity and immune dysfunction in chronic disease and cancer. *Reprod Toxicol*. 2011 Apr;31(3):319-26.
108. Alavanja MC, Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2012;15(4):238-63.
109. Li Q, Kawada T. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cell Mol Immunol*. 2006 Jun;3(3):171-8.
110. Schafer M, Koppe F, Stenger B, Brochhausen C, Schmidt A, Steinritz D, et al. Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells. *Chem Biol Interact*. 2013 Dec 5;206(3):472-8.
111. Wang CY, Wu CL, Tsan YT, Hsu JY, Hung DZ, Wang CH. Early onset pneumonia in patients with cholinesterase inhibitor poisoning. *Respirology*. 2010 Aug;15(6):961-8.
112. Zikos C, Evangelou A, Karachaliou CE, Gourma G, Blouchos P, Moschopoulou G, et al. Commercially available chemicals as immunizing haptens for the development of a polyclonal antibody recognizing carbendazim and other benzimidazole-type fungicides. *Chemosphere*. 2015 Jan;119 Suppl:S16-20.
113. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Carbamate pesticide-induced apoptosis in human T lymphocytes. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Apr 1;12(4):3633-45.
114. Helali I, Ferchichi S, Maaouia A, Aouni M, Harizi H. Modulation of macrophage functionality induced in vitro by chlorpyrifos and carbendazim

- pesticides. *J Immunotoxicol*. 2016 Sep;13(5):745-50.
115. Singhal LK, Bagga S, Kumar R, Chauhan RS. Down regulation of humoral immunity in chickens due to carbendazim. *Toxicol In Vitro*. 2003 Oct-Dec;17(5-6):687-92.
 116. Casale GP, Bavari S, Connolly JJ. Inhibition of human serum complement activity by diisopropylfluorophosphate and selected anticholinesterase insecticides. *Fundam Appl Toxicol*. 1989 Apr;12(3):460-8.
 117. Fournier M, Chevalier G, Nadeau D, Trottier B, Krzystyniak K. Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. *J Toxicol Environ Health*. 1988;25(1):103-18.
 118. Bernier J, Girard D, Krzystyniak K, Chevalier G, Trottier B, Nadeau D, et al. Immunotoxicity of aminocarb. III. Exposure route-dependent immunomodulation by aminocarb in mice. *Toxicology*. 1995 May 5;99(1-2):135-46.
 119. Luster MI, Kimber I. Immunotoxicity: hazard identification and risk assessment. *Hum Exp Toxicol*. 1996 Dec;15(12):947-8.
 120. Howes S.C. Cryo-electron microscopy studies of microtubules and microtubule associated proteins: tubulin acetylation, engineered kinesins, yeast microtubules, and PRC1. University of California, 2015. [Internet]. URL: https://digitalassets.lib.berkeley.edu/etd/ucb/text/Howes_berkeley_0028E_15878.p
 121. Clement MJ, Rathinasamy K, Adjadj E, Toma F, Curmi PA, Panda D. Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin. *Biochemistry*. 2008 Dec 9;47(49):13016-25.
 122. Sarraf AM, Arce GT, Krahn DF, O'Neil RM, Reynolds VL. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities. *Mutat Res*. 1994 Apr;321(1-2):43-56.
 123. Li Z, Wang Z, Li S. Gene chip analysis of Arabidopsis thaliana genomic DNA methylation and gene expression in response to carbendazim. *Biotechnol Lett*. 2015 Jun;37(6):1297-307.
 124. Verma S, Srivastava A. Cyto-genotoxic consequences of carbendazim

treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. Environ Monit Assess. 2018 Mar 21;190(4):238.

125. Kuchy AH, Wani AA, Kamili AN. Cytogenetic effects of three commercially formulated pesticides on somatic and germ cells of *Allium cepa*. Environ Sci Pollut Res Int. 2016 Apr;23(7):6895-906.

126. Behera BN, Sahu RK, Sharma CB. Cytogenetic hazards from agricultural chemicals. 4. Sequential screening in the barley progeny test for cytogenetic activity of some systemic fungicides and a metabolite. Toxicol Lett. 1982 Feb;10(2-3):195-203.

127. Маскаева ТА, Лабутина МВ, Чегодаева НД. Цитогенетическое влияние пестицидов на *Hordeum Vulgare* L. и *Pisum Sativum* L. Успехи соврем. науки. 2016;3(10):108-12.

128. Hashem MA, Mohamed WAM, Attia ESM. Assessment of protective potential of *Nigella sativa* oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jan;25(2):1270-82.

129. Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. Environ Mol Mutagen. 1995;26(4):292-304.

130. Bentley KS, Kirkland D, Murphy M, Marshall R. Evaluation of thresholds for benomyl- and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. Mutat Res. 2000 Jan 3;464(1):41-51.

131. Can A, Albertini DF. Stage specific effects of carbendazim (MBC) on meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. Mol Reprod Dev. 1997 Mar;46(3):351-62.

132. Sarraf AM, Bentley KS, Fu LJ, O'Neil RM, Reynolds VL, Stahl RG. Evaluation of benomyl and carbendazim in the *in vivo* aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow. Mutat Res. 1994 Oct 1;310(1):143-9.

133. Ashby J, Tinwell H. Continuing ability of the rodent bone marrow micronucleus assay to act as a predictor of the possible germ cell mutagenicity of chemicals. Mutat Res. 2001 Jul 1;478(1-2):211-3.

134. Vanhauwaert A, Vanparys P, Kirsch-Volders M. The *in vivo* gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. *Mutagenesis*. 2001 Jan;16(1):39-50.
135. Kara M, Jannuzzi AT, Yon S. In-Vitro investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of benzimidazole group pesticides benomyl and carbendazim *J Toxicol Cur Res*. 2019;3:007.
136. Laryea D, Gullbo J, Isaksson A, Larsson R, Nygren P. Characterization of the cytotoxic properties of the benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, in human tumour cell lines and primary cultures of patient tumour cells. *Anticancer Drugs*. 2010 Jan;21(1):33-42.
137. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. Chemicals evaluated for carcinogenic: potential annual cancer report 2018 [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. URL: http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf.
138. Carbendazim [MAK Value Documentation, 2011] [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/3527600418.mb1060521e5014>.
139. Silva RC, Barros KA, Pavao AC. Carcinogenicity of carbendazim and its metabolites. *Quim Nova*. 2014;37(8):1329-34.
140. Borzsonyi M, Pinter A, Surjan A, Farkas I. Transplacental induction of lymphomas in Swiss mice by carbendazim and sodium nitrite. *Int J Cancer*. 1976 Jun 15;17(6):742-7.
141. Taylor J, Watson M, prepared. Thiophanate-methyl [Internet]. [cited 2020 Jan 20]. URL: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr17.htm>.
142. IPCS INCHEM. WHO/FAO data sheet on pesticides №. 87. Benomyl Geneva. [Internet]. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61383>.
143. Spitta LF, Diegeler S, Baumstark-Khan C, Hellweg CE. An in-vitro approach for water quality determination: activation of NF- κ B as marker for cancer-related stress responses induced by anthropogenic pollutants of drinking water. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Feb;25(5):3985-95.
144. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic.

Curr Mol Med. 2007 Nov;7(7):619-37.

145. Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die? Curr Biol. 1997 Feb 1;7(2):R94-6.

146. Hellweg CE. The Nuclear Factor κ B pathway: A link to the immune system in the radiation response. Cancer Lett. 2015 Nov 28;368(2):275-89.

147. Habraken Y, Piette J. NF-kappaB activation by double-strand breaks. Biochem Pharmacol. 2006 Oct 30;72(9):1132-41.

148. Trickey M, Fujimitsu K, Yamano H. Anaphase-promoting complex/cyclosome-mediated proteolysis of Ams2 in the G1 phase ensures the coupling of histone gene expression to DNA replication in fission yeast. J Biol Chem. 2013 Jan 11;288(2):928-37.

149. Jiang J, Wu S, Wang Y, An X, Cai L, Zhao X, et al. Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. Toxicol In Vitro. 2015 Oct;29(7):1473-81.

150. IARC. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans Preamble [Internet]. 2016 [cited 2020 Jan 23]. URL: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/CurrentPreamble.pdf>.

151. OECD. Guidance document 116 on the conduct and design of chronic toxicity and carcinogenicity studies, supporting test guidelines 451, 452 and 453 [Internet]. 2012 [cited 2020 Jan 23]. URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264221475-en.pdf>.

152. OECD/OCDE. OECD guideline for the testing of chemicals: carcinogenicity studies [Internet]. 2018 [cited 2020 Jan 23]. URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071186-en.pdf?expires=1601234025&id=id&accname=guest&checksum=B8754CA8AD7C370627E60813B9858555>.

153. OECD. Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies [Internet]. 2002 [cited 2020 Jan 23]. URL: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264078499-en.pdf>.

154. Гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності (ДСП

8.8.1.2.002-98): постанова Першого заступника Головного санітарного лікаря України № 2 від 28.08.1998 р. [Інтернет]. [2020 Січ 23]. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/va002282-98#Text>

155. Антонович ЕА, Каган ЮС, Спыну ЕИ, Белоножко ГА, Болотный АВ, Бурый ВС, и др., составители. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов [Интернет]. [цитировано 2020 Янв 23]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200092699>.

156. Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal: reports of IARC ad hoc Working Groups which met in Hanover, F.R.G., 7-9 June, 1979, at a meeting organized by the Medizinische Hochschule Hanover, the Commission of the European Communities and the IARC. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1980. 426 p.

157. FAO UN. FAO Specifications for Plant Protection Products Carbendazim (AGP: CP/220) [Internet]. Rome; 1992 [cited 2020 Jan 23]. URL: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/CBZ2.pdf.

158. Turusov VS, Mohr U, editors. Tumours of the rat. 2nd ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; New York: Distributed in the USA by Oxford University Press; 1990. xiv, 748 p.

159. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel: Эксперим. исслед. Клин. испытания. Анализ фармац. рынка. 2-е изд., доп. Киев: МОРИОН; 2001. 407 с.

160. Турусов ВС, Парфенов ЮД. Методы выявления и регламентирования химических канцерогенов. М.: Медицина; 1986. 149, [2] с.

161. FDA. Statistical aspects of the design, analysis, and interpretation of chronic rodent carcinogenicity studies of pharmaceuticals: guidance for industry [Internet]. 2001 May [cited 2020 Apr 23]. URL: <https://www.fda.gov/media/72296/download>.

162. Turusov VS, editor-in-chief. Tumours of the mouse. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1979. xii, 661 p.

163. Меньшиков ВВ, редактор. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина; 1987. 364, [1] с.
164. Хейхоу ФГД, Кваглино Д. Гематологическая цитохимия: пер. с англ. М.: Медицина; 1983. 319 с.
165. Абдулкадыров КМ, редактор. Гематология: новейший справ.: [соврем. клин. гематология, методы диагностики и лечения заболеваний системы крови, новейшие данные о кроветворении, морфология и функции клеток крови и кост. мозга]. М.: Эксмо; СПб.: Сова; 2004. 927 с.
166. Pubertal development and thyroid function in intact juvenile/peripubertal male rats assay: OCSP Guideline 890.1500 [Internet]. 2011 Aug [cited 2020 Aug 20]. URL: https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/final_890.1500_male_purbertal_assay_sep_8.24.11.pdf.
167. Creasy D, Cartwright J, Moreland S, Willoughby C, Collier M, Odum J, contributors. Endocrine disruption: a guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests [Internet]. 2008 [cited 2020 Jan 23]. URL: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/40638492.pdf>.
168. Ito N, Imaida K, Hirose M, Shirai T. Medium-term bioassays for carcinogenicity of chemical mixtures. Environ Health Perspect. 1998 Dec;106(Suppl 6):1331-6.
169. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононський ОІ. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології: навч. посіб. Житомир: Полісся; 2005. 286 с.
170. Лойда З, Госсрау Р, Шиблер Т. Гистохимия ферментов: Лаб. методы: пер. с англ. М.: Мир; 1982. 272 с.
171. Weber K. Differences in types and incidence of neoplasms in Wistar Han and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2017 Jan;45(1):64-75.
172. Hojo M, Sakamoto Y, Maeno A, Tayama K, Tada Y, Yuzawa K, et al. A histopathological analysis of spontaneous neoplastic and non-neoplastic lesions in aged male RccHan:WIST rats. J Toxicol Pathol. 2020 Jan;33(1):47-55.
173. Лісовська ВС, Недопитанська НМ, Решавська ОВ, Баглій ЄА.

Канцерогенність карбендазиму: дослідження у хронічному експерименті на щурах Wistar. Вісн. проблем біології і медицини. 2020;(1):321-8.

174. MGI. Inbred strains of mice: CBA [Internet]. [cited 2020 Apr 20]. URL: http://www.informatics.jax.org/inbred_strains/mouse/docs/CBA.shtml.

175. Бландова ЗК, Душкин ВА, Малашенко АМ, Шмидт ЕФ. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука; 1983. 191 с.

176. Лісовська ВС, Недопитанська НМ, Решавська ОВ, Терещенко НВ, Баглій ЄА. Ідентифікація канцерогенності карбендазиму: експериментальне дослідження на мишах лінії СВА. Укр. журн. сучас. проблем токсикології. 2019;(3):18-23.

177. Новик АА, Богданов АН. Анемии (от А до Я): рук. для врачей. СПб.: Нева; М.: Нац. мед.-хирург. центр; 2004. 314, [1] с.

178. Болдырев АА, редактор. Биохимия мембран. Кн. 1, Введение в биохимию мембран. М.: Высш. шк.; 1986. 109, [3] с.

179. Шевченко ТМ, Полушкін ПМ. Електронний посібник до вивчення курсу “Основи загальної клінічної лабораторної діагностики” [Інтернет]. Дніпропетровськ: ДНУ; 2016 [цитовано 2020 Квіт 20]. 138 с. URL: http://repository.dnu.dp.ua:1100/upload/17ba1fd9082bc67d1a6d5b0828504ea1Osnovi_zagal%27noyi_klinichnoyi_laboratornoyi_.PDF.

180. Лісовська ВС, Жмілько ПГ, Шуляк ВГ. Оцінка токсичного впливу карбендазиму на систему крові щурів за умов гострої пероральної інтоксикації. Вісн. проблем біології і медицини. 2018;(2):117-22.

181. Лисовская ВС, Жминько ПГ, Шуляк ВГ. Влияние карбендазима на систему крови крыс в условиях хронической пероральной интоксикации. Вісн. проблем біології і медицини. 2019;(2 Т 1):152-6.

182. Durand P, Martin G, Blondet A, Gilleron J, Carette D, Janczarski S, et al. Effects of low doses of carbendazim or iprodione either separately or in mixture on the pubertal rat seminiferous epithelium: An ex vivo study. Toxicol In Vitro. 2017 Dec;45(Pt 3):366-73.

183. Баглей ЕА, Недопитанская НН, Лисовская ВС. Особенности влияния Карбендазима на эндокринную систему и пубертатное развитие крыс-самцов. Развитие крыс-самцов. Сучас. проблеми токсикології, харч. та хім. безпеки. 2015;(3):34-47.
184. Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res.* 2014;122:103-41.
185. Лісовська ВС. Експресія гамма-глутамілтрансферази у гепатоцитах щурів за дії генеричного карбендазиму на моделі гепатоканцерогенезу “НДДА-гепатектомія”. Вісн. проблем біології і медицини. 2019;(4 Т 2):130-5.
186. Анисимов ВН. Спонтанные опухоли у крыс различных линий. *Вопр. онкологии.* 1976;(8):98-110.
187. Bomhard E, Karbe E, Loeser E. Spontaneous tumors of 2000 Wistar TNO/W.70 rats in two-year carcinogenicity studies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1986 Sep-Dec;7(1-2):35-52.
188. Poteracki J, Walsh KM. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: a comparison of reviews. *Toxicol Sci.* 1998 Sep;45(1):1-8.
189. Giknis MLA, Clifford CB, prepared. Spontaneous neoplasms and survival in Wistar Han rats: compilation of control group data [Internet]. 2003 Mar [cited 2020 Jan 23]. URL: https://www.criver.com/sites/default/files/resources/rm_rm_r_survival_wistar_han_rats_compilation_data.pdf.
190. Hao D, Rizzo JD, Stringer S, Moore RV, Marty J, Dexter DL, et al. Preclinical antitumor activity and pharmacokinetics of methyl-2-benzimidazolecarbamate (FB642). *Invest New Drugs.* 2002 Aug;20(3):261-70.
191. Hammond LA, Davidson K, Lawrence R, Camden JB, Von Hoff DD, Weitman S, et al. Exploring the mechanisms of action of FB642 at the cellular level. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001 May;127(5):301-13.
192. Pfeil R, Dellarco V. Carbendazim (addendum) [Internet]. 2005 [cited 2020 Jan 20]. URL: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2005pr05.pdf>.
193. European Commission. Review report for the active substance carbendazim finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its

meeting on 3 March 2006 in view of the inclusion of carbendazim in Annex I of Directive 91/414/EEC [Internet]. 2007 Jan 5 [cited 2020 Apr 20]. URL: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.ViewReview&id=126>.

194. Rajeswary S, Mathew N, Akbarsha MA, Kalyanasundram M, Kumaran B. Protective effect of vitamin E against carbendazim-induced testicular toxicity-histopathological evidences and reduced residue levels in testis and serum. *Arch Toxicol*. 2007 Nov;81(11):813-21.

195. Lu SY, Liao JW, Kuo ML, Hwang JS, Ueng TH. Antagonistic and synergistic effects of carbendazim and flutamide exposures in utero on reproductive and developmental toxicity in rats. *J Food Drug Anal*. 2006;14(2):120-32.

196. Lim J, Miller MG. Role of testis exposure levels in the insensitivity of prepubertal rats to carbendazim-induced testicular toxicity. *Fundam Appl Toxicol*. 1997 Jun;37(2):158-67.

197. Song YC, Yu GC, Wang XF. Effects of carbendazim on androgen levels in male rats [Internet]. 2011 [2020 Apr 20]. URL: https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-WSDL201101007.htm.

198. Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, Sharpe RM, Foster PM. Rodent Leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans. *Crit Rev Toxicol*. 1999 Mar;29(2):169-261.

199. Barlas N, Selmanoglu G, Songur S, Kockaya A, Erdemli E. Biochemical and histopathological effects of carbendazim to rat male reproduction. *Pesticidi*. 2002 Jan;17(1-2):59-71.

200. Hsu YH, Chang CW, Chen MC, Yuan CY, Chen JH, Ma JT, et al. Carbendazim-induced androgen receptor expression antagonized by flutamide in male rats. *J Food Drug Anal*. 2011;19(4):418-28.

201. Markelewicz RJ Jr, Hall SJ, Boekelheide K. 2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules. *Toxicol Sci*. 2004 Jul;80(1):92-100.

202. Song Yuan Chao. Study on the mechanism of the carbendazim-induced

reproductive toxicity in male rats [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 20]. URL: <https://www.dissertationtopic.net/doc/155382>.

203. Sakr SA, Shalaby SY. Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract. *Toxicol Ind Health*. 2014 Apr;30(3):259-67.

204. Hurley PM. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect*. 1998 Aug;106(8):437-45.

205. Christianson D, Roti E, Vagenakis AG, Braverman LE. The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated. *Endocrinology*. 1981 Feb;108(2):529-35.

206. Catalano S, Pezzi V, Chimento A, Giordano C, Carpino A, Young M, et al. Triiodothyronine decreases the activity of the proximal promoter (P_{II}) of the aromatase gene in the mouse Sertoli cell line, TM4. *Mol Endocrinol*. 2003 May;17(5):923-34.

207. Лисовская ВС, Недопитанская НН, Баглей ЕА, Решавская ЕВ, Ткаченко ЛВ. Влияние пендиметалина на эндокринную систему крыс-самцов в препубертатном периоде. *Сучас. проблеми токсикології, харч. та хім. безпеки*. 2016;(4):18-27.

208. Kaur R, Kaur G, Gill RK, Soni R, Bariwal J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur J Med Chem*. 2014 Nov 24;87:89-124.

209. Parker AL, Teo WS, McCarroll JA, Kavallaris M. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 4;18(7):1434.

210. Manavathi B, Acconcia F, Rayala SK, Kumar R. An inherent role of microtubule network in the action of nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 24;103(43):15981-6.

211. Dave RH, Saengsawang W, Yu JZ, Donati R, Rasenick MM. Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. *Neurosignals*. 2009;17(1):100-8.

212. Cote M, Payet MD, Gallo-Payet N. Association of alpha S-subunit of the GS

protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*. 1997 Jan;138(1):69-78.

213. Roychowdhury S, Rasenick MM. Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric Gproteins. *FEBS J*. 2008 Oct;275(19):4654-63.

214. Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect*. 2004 Apr;112(5):524-31.

215. Проданчук МГ, Баглій ЄА, Жмілько ПГ, Кравчук АП, Недопитанська НМ. Оцінка небезпечності пестицидів за критерієм ендокринних порушень через механізм їх взаємодії з рецепторами статевих гормонів людини. *Соврем. проблемы токсикологии*. 2005;(4):4-11.

216. Vinblastine sulfate [Internet]. [cited 2020 Apr 20]. URL: <https://www.pharmacompass.com/chemistry-chemical-name/vinblastine-sulfate>.

217. Черниченко ІО, Литвиченко ОМ, Соверткова ЛС. До проблеми контролю канцерогенних нітрозамінів у продуктах харчування. *Журн. Хроматогр. т-ва*. 2002;2(1):11-9.

218. Park JE, Seo JE, Lee JY, Kwon H. Distribution of seven N-nitrosamines in food. *Toxicol Res*. 2015 Sep;31(3):279-88.

219. Лісовська ВС, Недопитанська НМ, Решавська ОВ. Добір гістохімічних маркерів передпухлинних пошкоджень печінки білих нелінійних щурів. *Соврем. проблемы токсикологии*. 2000;(5):3-8.

220. Баглей ЕА, Недопитанская НН, Решавская ЕВ, Лисовская ВС. Идентификация канцерогенности технических продуктов пестицидов-генериков с помощью кратко- и среднесрочных тестов. *Сучас. проблеми токсикології, харч. та хім. безпеки*. 2014;(3-4):32-7.

221. Omelchuk S, Syrota A, Vavrinevych O, Blagaia A, Lisovska V, Reshavska O. 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. *Wiad Lek.* 2018;71(7):1274-80.

222. Ruhlen RL, Howdeshell KL, Mao J, Taylor JA, Bronson FH, Newbold RR, et al. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the “fetal estrogenization syndrome” and obesity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect.* 2008 Mar;116(3):322-8.

223. Knower KC, To SQ, Leung YK, Ho SM, Clyne CD. Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. *Endocr Relat Cancer.* 2014 Mar 12;21(2):T33-55.

224. Swenberg JA, Dietrich DR, McClain RM, Cohen SM. Species-specific mechanisms of carcinogenesis [Internet]. [cited 2020 Apr 20]. URL: http://kops.uni-konstanz.de/bitstream/handle/123456789/7181/Species_specific_mechanisms_of_carcinogenesis.pdf?sequence=1.

225. Species differences in thyroid, kidney and urinary bladder carcinogenesis. Proceedings of a consensus conference. Lyon, France, 3-7 November 1997. IARC Sci Publ. 1999;(147):1-225.

226. Nolte T, Rittinghausen S, Kellner R, Karbe E, Kittel B, Rinke M, et al. RITA – Registry of Industrial Toxicology Animal data: the application of historical control data for Leydig cell tumors in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2011 Nov;63(7-8):645-56.

227. Russo J. Significance of rat mammary tumors for human risk assessment. *Toxicol Pathol.* 2015 Feb;43(2):145-70.

228. Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol.* 2012 Aug;40(6 Suppl):40S-121S.

Додаток А

Таблиця А.1

Гістоморфологічний аналіз непухлинної патології щурів Wistar, виявленої в хронічному експерименті

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ГІПОФІЗ	- гіперемія	0	2	1	0	1	1	1	0
	- гіперплазія аденогіпофізу	0	1	0	0	0	0	0	1
ЩИТОПОДІБНА ЗАЛОЗА	- гіперемія	5	4	5	4	4	5	3	7
	- дегенеративні зміни	5	3	2	12	12	13	7	10
	- склероз	0	0	1	0	1	0	2	0
	- фетальна структура	2	9	7	4	7	3	3	3
	- вузлуватий зоб	0	0	0	0	0	0	1	0
	- гіпертрофія	0	0	0	0	0	0	0	1
	- гіперплазія	0	0	1	1	4	1	2	2
ПАРАЩИТОПОДІБНІ ЗАЛОЗИ	- гіпертрофія	0	1	0	0	0	0	0	0
	- гіперплазія	0	1	0	0	1	1	0	1

Продовження табл. А.1

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ТИМУС	- інволюція	2	1	4	3	4	4	6	2
ЛЕГЕНІ	- гіперемія	13	5	9	10	8	7	7	10
	- пневмонія	8	14	10	8	8	4	10	10
	- проліферація епітелію бронхів	0	0	1	2	1	3	1	3
	- осередки пневмосклерозу	0	3	1	2	1	3	0	1
	- абсцес(и)	5	5	7	2	5	1	3	0
СЕРЦЕ	- набряк	0	0	2	0	1	0	3	0
	- зерниста дистрофія міокардіоцитів	4	4	5	4	2	5	4	2
	- атрофія міокардіоцитів	2	1	1	1	0	2	1	0
	- кардіосклероз	0	0	1	1	2	0	1	2
	- гіпертрофія міокардіоцитів	0	0	0	1	2	2	1	0
	- перикардит	1	0	0	0	0	0	0	1
ПЕЧІНКА	- гіперемія	10	3	3	11	5	7	9	11
	- осередковий некроз гепатоцитів	0	2	4	0	3	4	4	1

Продовження табл. А.1

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ПЕЧІНКА	- деструктивно-дистрофічні зміни	8	12	13	19	15	16	20	15
	- проліферація жовчних протоків	0	0	0	1	1	0	0	2
	- холангіофіброз	0	1	0	1	3	0	4	0
	- гепатит	1	1	2	0	0	0	0	1
	- екстрамедулярний гемопоез	0	2	0	0	0	1	0	0
	- цироз	1	0	0	0	0	0	2	0
СЕЛЕЗІНКА біла пульпа	- зменшення розмірів і кількості фолікулів	7	1	0	7	10	1	10	7
	- некроз фолікулів	0	4	0	1	2	1	1	1
червона пульпа	- гіперемія	7	7	10	9	11	14	15	11
	- дегенеративні зміни	3	5	4	9	9	8	7	8
	- екстрамедулярний гемопоез	0	2	0	0	0	1	0	0
НИРКИ	- гіперемія	16	15	15	16	21	21	23	14
кора	- деструктивно-дистрофічні зміни	7	17	10	8	17	18	18	10

Продовження табл. А.1

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
кора	- преципітати білка	4	5	7	6	4	5	6	4
	- мікропетрифікати	1	0	0	0	4	5	1	4
	- нефрит	1	1	4	2	5	1	3	5
	- абсцес	0	1	1	1	1	2	1	0
	- полікістоз	2	1	3	6	0	0	2	3
лоханка	- папіломатоз	0	0	0	1	0	0	0	0
СЕЧОВИЙ МІХУР	- папіломатоз	0	0	0	0	1	0	0	0
	- цистит	2	0	0	0	0	0	0	0
НАДНИРКОВІ ЗАЛОЗИ кора	- гіперемія	4	10	3	3	2	7	10	9
	- кіста геморагічна	0	2	1	1	0	0	2	0
	- стоншення	0	0	9	2	1	0	3	2
	- гіперплазія адренокортикоцитів	1	1	1	2	4	2	3	4
мозкова речовина	- повнокров'я центральної вени	1	7	0	2	3	0	1	0

Продовження табл. А.1

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ПІДСЛУНКОВА ЗАЛОЗА екзокринна частина	- жирова дистрофія панкреоцитів	0	0	0	0	0	4	3	2
	- осередкові некрози	0	1	1	3	0	1	2	2
	- панкреатит	1	0	0	0	2	1	0	0
ШЛУНОК	- гіперкератоз	0	0	0	1	0	0	0	0
СІМ'ЯНІ ПУХИРЦІ	- гіперемія	0	1	0	2	-	-	-	-
	- кіста	0	1	0	0	-	-	-	-
	- гіперплазія епітелію	0	1	0	0	-	-	-	-
СІМ'ЯНИКИ	- гіперемія	1	2	3	2	-	-	-	-
	- набряк	3	2	0	1	-	-	-	-
	- дегенеративні зміни, атрофія	6	9	21*	31*	-	-	-	-
	- лейдигоклітинна гіперплазія (сегментарна)	0	1	1	3	-	-	-	-
МАТКА	- гіперемія	-	-	-	-	2	2	4	1
ендометрій	- плоскоклітинна метаплазія	-	-	-	-	0	0	0	2

Продовження табл. А.1

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ендометрій	- ендометрит	-	-	-	-	2	6	5	1
	- некроз	-	-	-	-	0	2	0	2
	- залозиста гіперплазія	-	-	-	-	3	0	0	4
	- папіломатоз	-	-	-	-	0	0	2	1
ЯЄЧНИКИ	- серозна кіста	-	-	-	-	3	9	4	1
	- абсцес	-	-	-	-	2	1	0	3
ШКІРА	- гіперкератоз	0	0	0	0	0	0	1	0

Примітка. * – статистична достовірність ($p \leq 0,05$) порівняно з негативним контролем за однобічним точним критерієм Фішера.

Таблиця А.2

Гістоморфологічний аналіз непухлинної патології мишей СВА, виявленої в хронічному експерименті

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ЩИТОПОДІБНА ЗАЛОЗА	- гіперемія	0	0	1	0	0	0	0	0
	- гіпофункція	1	3	2	0	0	1	0	0
ЛЕГЕНІ	- гіперемія	8	21	15	10	8	12	8	7
	- осередки пневмосклерозу	0	1	0	0	0	0	0	0
	- пневмонія/абсцес(и)	1	5	2	4	5	5	3	7
СЕРЦЕ	- гіперемія	1	0	0	0	0	0	0	1
	- дистрофія міокардіоцитів	0	1	2	1	0	1	0	1
	- гіпертрофія міокардіоцитів	0	1	1	0	1	0	0	0
	- осередки кальцинозу	1	0	0	2	0	3	0	0
ПЕЧІНКА	- водно/білкова дистрофія	7	6	4	2	10	5	4	10
	- жирова дистрофія	2	4	4	3	2	1	2	3
	- інфільтрати	2	6	3	3	7	3	0	7

Продовження табл. А.2

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
ПЕЧІНКА	- гіперемія	2	9	5	5	0	3	2	3
	- осередки некрозу	8	7	10	5	7	7	3	10
	- гіперплазія гепатоцитів	0	1	1	0	0	0	1	0
	- гіперплазія ендотелію судин	0	0	1	0	0	0	0	0
	- амілоїдоз	2	8	2	3	4	1	0	2
НИРКИ	- гіперемія кори	8	19	7	4	6	5	2	7
	- “лапчатість” клубочків	1	2	2	1	1	0	0	0
	- дистрофія нефроцитів	0	0	2	2	3	0	0	1
	- білок у канальцях	1	5	2	1	0	2	0	0
	- некробіоз нефроцитів	1	0	1	0	5	0	0	1
	- інфільтрати	1	6	1	1	3	4	0	1
	- амілоїдоз	1	4	1	3	2	1	0	2
	- полікістоз	1	2	2	2	0	0	0	0
	- кіста	0	0	1	0	0	0	0	0

Продовження табл. А.2

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
НАДНИРКОВІ ЗАЛОЗИ	- амілоїдоз	1	1	0	0	1	0	0	1
ПІДШЛУНКОВА ЗАЛОЗА	- панкреатит	0	2	1	0	0	0	0	0
СЕЛЕЗІНКА	- гіперемія червоної пульпи	0	7	2	3	6	2	2	5
	- збільшення кількості сідерофагів	0	0	1	0	0	0	2	0
	- амілоїдоз	3	10	6	1	3	3	0	2
ШЛУНОК	- інфільтрація	0	1	1	0	0	0	0	0
	- гіперплазія рогового епітелію	0	2	0	0	0	0	0	0
КИШЕЧНИК	- інфільтрація	0	2	0	0	0	1	0	0
	- некроз ворсинок	0	1	0	0	0	0	0	0
	- кальцифікація	0	0	0	2	1	0	0	0
СЕЧОВИЙ МІХУР	- гіперплазія епітелію	0	1	0	1	0	0	0	0
СІМ'ЯНІ ПУХИРЦІ	- застій секрету	2	2	6	7	-	-	-	-
	- гіперплазія епітелію	0	1	0	0	-	-	-	-
	- атрофія	0	0	0	1	-	-	-	-

Продовження табл. А.2

Органи	Гістопатологія	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
СІМ'ЯНІ ПУХИРЦІ	- абсцес(и)	1	0	0	0	-	-	-	-
СІМ'ЯНИКИ	- часткове/спустошення каналців	2	6	2	3	-	-	-	-
	- кальцифікація	5	1	1	4	-	-	-	-
МАТКА	- гіперемія	-	-	-	-	1	1	0	0
	- залозиста гіперплазія	-	-	-	-	1	0	0	1
ЯЄЧНИКИ	- серозна кіста	-	-	-	-	4	3	6	10
	- геморагічна кіста	-	-	-	-	0	1	0	0
	- абсцес(и)	-	-	-	-	1	1	0	1

Додаток Б

Таблиця Б.1

Гематологічні показники самців (n=5) і самиць (n=5) щурів

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Еритроцити, Г/л	контроль	7,77±0,25	7,37±0,31	7,89±0,35	7,88±0,21	7,64±0,23	7,95±0,24	7,03±0,41	7,17±0,11
	4	8,07±0,42	7,58±0,13	8,36±0,47	7,80±0,19	8,48±0,13	8,35±0,20	7,99±0,35	7,79±0,44
	13	8,71±0,28	8,67±0,39	8,18±0,55	8,05±0,19	8,22±0,33	7,75±0,22	7,61±0,56	7,70±0,12
	26	8,71±0,21	8,98±0,38	8,65±0,25	8,61±0,58	7,86±0,35	7,74±0,12	8,51±0,55	8,06±0,42
	39	8,54±0,16	8,47±0,24	8,49±0,06	8,58±0,05	7,96±0,30	7,81±0,40	8,63±0,38	7,98±0,39
	52	8,65±0,53	8,74±0,39	8,95±0,49	9,44±0,39	7,38±0,33	7,77±0,24	7,93±0,46	7,83±0,30
	78	9,32±0,63	10,14±0,40	9,82±0,35	9,52±0,74	7,52±0,17	7,51±0,76	7,71±0,83	7,71±0,58
	104	9,06±0,75	9,66±0,59	9,44±0,58	9,11±0,30	8,22±0,39	8,18±0,24	7,91±0,18	7,97±0,45
Гемоглобін, ммоль/л	контроль	9,36±0,24	9,33±0,33	9,36±0,24	9,41±0,12	9,02±0,23	9,03±0,23	9,07±0,43	9,03±0,29
	4	9,63±0,31	9,35±0,12	9,66±0,41	9,64±0,25	9,62±0	9,76±0,24	9,52±0,19	9,37±0,31
	13	10,78±0,12	10,73±0,12	10,45±0,37	10,34±0,24	9,87±0,24	9,93±0,13	9,81±0,31	9,82±0,19

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Гемоглобін, ммоль/л	26	9,53±0,12	9,63±0,12	9,76±0,36	9,98±0,19	9,41±0,17	9,30±0,12	9,41±0,12	9,28±0,12
	39	9,82±0,19	9,99±0,13	10,12±0,13	9,87±0,13	9,47±0,31	9,54±0,31	9,76±0,19	9,52±0,19
	52	9,87±0,24	10,03±0,19	10,04±0,19	10,38±0,31	9,21±0,27	9,69±0,19	9,69±0,19	9,71±0,19
	78	9,63±0,51	10,68±0,61	10,33±0,56	10,44±0,37	8,79±0,24	9,52±1,24	9,19±0,41	9,61±0,45
	104	10,18±0,43	10,15±0,25	10,22±0,43	10,04±0,31	9,82±0,19	9,53±0,25	9,21±0,27	9,69±0,12
Ретикулоцити, %	контроль	3,96±0,54	4,20±0,45	4,30±0,56	4,02±0,77	3,72±0,47	4,10±0,47	2,74±0,39	3,66±0,49
	4	2,64±0,54	2,66±0,58	1,82±0,32	2,32±0,47	2,08±0,43	2,18±0,21	1,64±0,26	1,88±0,36
	13	2,12±0,41	1,86±0,41	1,74±0,45	1,72±0,36	1,72±0,28	1,52±0,09	1,62±0,13	1,48±0,13
	26	1,64±0,15	1,58±0,15	1,92±0,06	1,74±0,15	1,36±0,19	1,40±0,17	1,62±0,17	1,38±0,24
	39	2,32±0,24	2,32±0,17	2,58±0,21	2,32±0,15	3,40±0,45	2,32±0,39	2,44±0,49	2,36±0,39
	52	2,98±0,24	3,26±0,49	2,60±0,39	2,72±0,21	6,56±0,99	4,74±0,79	4,58±0,26	6,28±0,28
	78	1,32±0,24	1,30±0,26	1,56±0,24	2,04±0,67	4,78±1,39	4,90±1,63	3,18±0,86	2,62±0,47
	104	2,56±0,30	2,88±0,43	3,12±0,32	3,50±0,67	2,56±0,34	3,04±0,32	3,20±0,58	3,06±0,47
СГЕ, фмоль	контроль	1,21±0,05	1,27±0,05	1,19±0,06	1,20±0,04	1,18±0,03	1,14±0,02	1,30±0,06	1,26±0,02

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
СГЕ, фмоль	4	1,20±0,07	1,23±0,02	1,16±0,05	1,24±0,05	1,13±0,02	1,17±0,01	1,19±0,04	1,21±0,04
	13	1,24±0,06	1,24±0,05	1,29±0,07	1,28±0,01	1,20±0,02	1,29±0,03 ^a	1,30±0,05	1,28±0,01 ^c
	26	1,09±0,01	1,08±0,04	1,13±0,02	1,17±0,06	1,20±0,03	1,20±0,02	1,12±0,06	1,15±0,04
	39	1,15±0,04	1,18±0,03	1,19±0,01 ^b	1,15±0,01	1,19±0,02	1,23±0,02	1,13±0,03	1,20±0,05
	52	1,15±0,04	1,15±0,03	1,13±0,06	1,10±0,03	1,25±0,02	1,25±0,03	1,23±0,05	1,24±0,03
	78	1,04±0,03	1,06±0,07	1,05±0,05	1,11±0,05	1,17±0,06	1,27±0,12	1,21±0,09	1,25±0,05
	104	1,13±0,05	1,06±0,05	1,08±0,02	1,10±0,02	1,20±0,05	1,16±0,01	1,17±0,05	1,23±0,06
Тромбоцити, Г/л	контроль	1220±128	1254±115	1261±122	1157±57	1157±52	1157±95	1118±105	1044±124
	4	881±42	1030±67	941±82	911±93	1076±58	1065±92	1030±72	1267±129
	13	739±45	743±52	658±60	673±44	793±62	807±61	770±55	834±52
	26	931±59	924±45	935±61	919±39	887±65	860±61	883±60	867±71
	39	895±43	882±43	840±34	837±30	847±65	834±71	939±52	888±51
	52	936±101	953±51	731±80	985±52	1228±105	1020±89	949±140	1019±94
	78	1038±181	849±146	937±224	736±118	1041±146	1031±147	953±117	783±47

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Тромбоцити, Г/л	104	1218±151	1270±141	1149±91	955±66	936±29	1072±99	1097±234	833±44
Лейкоцити, Г/л	контроль	19,58±2,85	18,96±1,82	18,72±2,68	19,16±2,19	19,38±1,55	18,32±2,49	18,36±2,96	18,06±2,70
	4	14,46±0,45	15,18±1,63	14,26±0,94	10,70±0,69 ^d	17,98±0,52	18,02±1,55	18,74±1,18	14,92±1,35
	13	17,76±1,95	16,88±1,44	15,54±1,74	16,26±1,22	16,44±0,90	15,76±1,82	14,22±1,61	17,58±0,82
	26	15,20±1,93	14,12±1,67	13,00±0,45	15,02±0,99	13,04±2,00	12,60±0,92	12,56±0,69	14,00±1,89
	39	14,72±2,00	13,98±2,04	12,30±0,60	13,02±0,62	8,74±1,22	7,88±1,37	7,90±0,36	6,90±0,71
	52	17,84±4,29	14,94±2,96	11,80±1,22	14,56±3,05	8,32±0,82	8,70±0,84	8,52±0,88	8,68±0,94
	78	22,70±3,67	17,34±2,96	14,06±3,05	12,98±2,36	10,36±2,40	14,84±5,49	6,66±0,71	8,70±0,97
	104	22,72±6,33	14,20±1,14	14,30±1,89	17,84±3,63	12,16±0,75	12,14±0,69	12,04±1,22	10,52±0,94
Гемограма, %:									
Еозинофіли	контроль	2,80±1,29	2,60±0,86	2,00±0,64	2,60±1,07	1,80±0,43	2,40±1,29	3,20±1,29	4,20±1,07
	4	2,60±0,86	3,40±1,72	1,60±0,86	2,00±1,07	1,60±0,86	3,00±1,29	3,80±1,07	2,20±0,86
	13	2,80±0,86	3,40±0,43	1,60±1,07	1,40±0,64	4,20±1,07	2,80±0,86	1,20±0,43 ^a	0,40±0,21 ^c
	26	2,40±1,29	3,20±1,50	0,80±0,43	1,00±0,43	1,20±0,64	1,20±0,86	1,00±0,64	1,60±1,29

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Еозинофіли	39	3,00±0,43	2,80±1,07	1,20±0,64 ^a	0,60±0,64 ^b	2,40±0,86	1,40±0,64	0,60±0,43	0,40±0,21
	52	2,20±1,07	4,60±1,93	2,00±0,43	1,40±0,64	3,00±0,64	1,60±0,86	1,60±0,86	1,00±0,43 ^a
	78	3,00±1,72	3,40±1,72	0,40±0,21	0,80±0,64	2,80±0,64	2,20±0,86	2,00±0,43	1,00±0,43 ^a
	104	2,80±1,72	4,00±0,86	2,80±1,29	0,60±0,43	1,60±0,86	1,80±0,64	1,40±0,64	2,00±0,64
Нейтрофільні метамієлоцити	контроль	0,20±0,21	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	0	0	0	0	0
	39	0,20±0,21	0	0	0,20±0,21	0	0	0,20±0,21	0
	52	0,20±0,21	0,20±0,21	0	0	0,20±0,21	0	0	0
	78	0,20±0,21	0,20±0,21	0	0	0,20±0,21	0,20±0,21	0,40±0,21	0
	104	0	0	0	0	0,20±0,21	0	0	0,80±0,64
Нейтрофіли паличкоядерні	контроль	1,40±0,21	2,20±1,29	1,20±0,64	1,20±0,64	1,00±0,43	1,80±0,86	1,80±0,43	2,20±0,64
	4	1,60±0,64	1,40±0,64	1,20±0,43	1,00±0,64	1,00±0,43	0,60±0,43	1,00±0,64	0 ^a

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Нейтрофіли паличкоядерні	13	0,80±0,64	0,60±0,43	0,40±0,21	0,80±0,43	0,40±0,21	0,40±0,21	0,60±0,21	0,40±0,21
	26	0,80±0,43	0,40±0,21	0,40±0,21	0,40±0,21	1,00±0,43	0,60±0,21	1,40±0,64	0,80±0,64
	39	1,40±0,43	3,20±0,64 ^a	2,00±0,86	2,60±1,07	1,60±0,43	1,40±0,64	0,80±0,43	0,60±0,43
	52	1,00±0,64	0,80±0,43	0,60±0,43	0,60±0,43	0,80±0,43	0,40±0,21	3,80±1,72	1,80±0,86
	78	0,60±0,21	2,20±1,07	2,20±1,07	1,20±0,64	2,60±0,86	1,00±0,43	2,60±0,64	2,60±0,43
	104	3,00±0,43	2,20±0,43	1,00±0,43 ^c	2,00±1,29	2,40±0,43	1,40±0,64	3,80±1,29	3,40±0,21
Нейтрофіли сегментоядерні	контроль	15,80±2,36	15,40±1,72	15,20±2,15	14,60±4,08	13,60±2,79	15,20±1,93	14,20±2,36	13,60±2,58
	4	13,80±1,93	15,80±1,50	13,20±2,79	11,60±2,58	11,60±1,50	12,40±1,93	13,40±1,93	10,20±2,58
	13	16,60±1,07	15,60±2,15	18,20±1,50	14,80±1,50	15,00±1,72	13,80±1,72	16,80±2,15	13,80±1,93
	26	16,00±1,72	15,60±0,86	16,80±2,15	15,40±1,72	12,20±2,15	14,80±0,86	13,60±1,93	15,80±1,93
	39	21,00±3,86	23,20±4,51	23,60±3,65	18,40±3,43	17,00±4,51	22,00±3,86	18,00±3,22	16,60±3,22
	52	14,20±2,15	21,20±2,79	23,00±5,15	21,60±4,51	19,00±3,00	15,40±1,72	12,20±1,07	13,60±2,58
	78	12,20±2,79	13,60±0,86	23,40±6,01	20,60±5,79	20,40±4,72	23,20±4,94	17,20±6,22	19,60±3,22
	104	24,00±4,51	26,00±3,00	23,20±6,22	27,20±5,79	18,80±2,58	18,60±5,36	21,00±3,86	22,80±2,58

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Усього нейтрофілів	контроль	17,40±2,15	17,60±1,50	16,40±2,15	15,80±4,51	14,60±3,22	17,00±1,93	16,00±2,58	15,80±1,93
	4	15,40±1,72	17,20±1,50	14,40±2,79	12,60±2,36	12,60±1,72	13,00±2,36	14,40±2,36	10,20±2,58
	13	17,40±1,29	16,20±1,93	18,60±1,72	15,60±1,93	15,40±1,72	14,20±1,50	17,40±1,93	14,20±1,93
	26	16,80±1,72	16,00±0,86	17,20±2,36	15,80±1,72	13,20±1,93	15,40±1,07	15,00±1,93	16,60±1,50
	39	22,60±3,86	26,40±4,94	25,60±3,43	21,20±4,08	18,60±4,51	23,40±4,08	19,00±3,65	17,20±3,22
	52	15,40±2,58	22,20±3,00	23,60±4,94	22,20±4,51	20,00±3,43	15,80±1,72	14,20±1,72	15,40±2,58
	78	13,00±2,58	16,00±1,50	25,60±6,87	21,80±5,79	23,20±4,72	24,40±5,15	20,20±6,87	22,20±3,22
	104	27,00±4,72	28,20±3,43	24,20±6,01	29,20±7,08	21,40±2,58	20,00±5,36	24,80±3,65	27,00±2,58
Лімфоцити	контроль	74,60±2,36	71,00±4,08	76,00±3,43	76,20±5,36	76,00±1,72	74,00±1,50	74,40±3,22	73,20±1,29
	4	72,80±3,22	70,80±3,86	74,20±3,86	78,20±2,36	80,40±2,15	79,80±3,65	77,80±1,72	82,20±1,93
	13	71,80±1,50	72,40±2,36	72,00±2,58	77,20±1,93	74,20±1,72	76,40±2,15	75,40±1,93	80,00±2,15
	26	76,60±1,93	75,80±1,93	77,20±3,00	78,20±2,79	80,20±0,86	78,60±1,50	78,20±2,58	76,00±1,93
	39	68,00±3,86	64,00±6,65	67,60±3,86	71,40±4,94	73,40±4,94	70,20±4,51	74,00±4,08	77,80±4,29
	52	78,20±3,22	66,80±4,08	69,20±5,58	70,60±4,94	73,00±3,86	77,80±3,00	79,80±1,07	78,00±2,79

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Лімфоцити	78	76,00±6,01	74,60±3,43	69,00±7,08	69,00±5,79	68,40±3,22	66,20±6,01	72,40±6,87	69,60±5,36
	104	63,60±4,94	55,60±4,08	62,00±9,44	55,60±5,79	70,20±0,86	71,80±7,30	67,60±4,08	66,80±2,79
Моноцити	контроль	5,00±1,29	6,00±1,93	5,60±1,07	5,20±1,50	6,80±1,93	6,40±1,50	6,20±1,93	5,60±0,64
	4	8,60±1,29	8,00±1,29	9,40±2,15	7,20±2,79	5,00±1,29	3,80±1,07	4,00±0,43	4,80±0,64
	13	7,60±1,72	7,60±1,50	7,20±1,29	5,40±0,64	5,60±1,07	6,00±2,15	5,60±1,29	5,20±0,86
	26	4,00±1,07	4,40±0,64	4,60±0,64	4,60±1,50	4,80±1,07	4,20±0,86	5,60±0,86	5,40±1,07
	39	6,40±1,72	6,80±1,72	5,60±1,93	5,80±1,72	5,60±0,64	5,00±1,29	6,80±0,64	4,40±0,86
	52	4,00±0,86	6,00±1,07	5,00±0,64	5,80±0,86	5,00±1,07	4,60±0,86	4,40±0,86	5,20±1,29
	78	7,80±1,72	5,80±1,72	5,00±1,93	8,00±2,58	5,40±1,07	7,20±1,72	5,40±1,72	7,00±2,36
	104	6,60±1,29	12,00±2,15	11,00±5,15	14,00±3,43	6,40±1,07	6,00±2,15	6,00±1,50	4,00±1,07
Базофіли	контроль	0,20±0,21	0	0	0,20±0,21	0,80±0,43	0,20±0,21	0,20±0,21	1,20±0,64
	4	0,60±0,21	0,60±0,43	0,40±0,21	0 ^b	0,40±0,21	0,40±0,21	0	0,60±0,21
	13	0,40±0,43	0,40±0,21	0,60±0,21	0,40±0,21	0,60±0,21	0,60±0,43	0,40±0,43	0,20±0,21
	26	0,20±0,21	0,60±0,43	0	0,40±0,21	0,60±0,21	0,60±0,21	0,20±0,21	0,40±0,21

Продовження табл. Б.1

Показники	Термін дослідження, тижні	Самці, доза карбендазиму, мг/кг				Самиці, доза карбендазиму, мг/кг			
		0	5	25	75	0	5	25	75
Базофіли	39	0	0	0	0	0	0	0	0,20±0,21
	52	0,20±0,21	0,40±0,21	0,20±0,21	0	0,80±0,21	0,20±0,21	0 ^c	0,40±0,21
	78	0,20±0,21	0,20±0,21	0	0,40±0,21	0,20±0,21	0	0	0,20±0,21
	104	0	0,20±0,21	0	0,60±0,21 ^a	0,40±0,21	0,40±0,43	0,20±0,21	0,20±0,21

Примітка. ^a – статистична достовірність ($p \leq 0,05$) відносно негативного контролю за t-критерієм Стюдента; ^b – статистична достовірність ($p \leq 0,02$) відносно негативного контролю за t-критерієм Стюдента; ^c – статистична достовірність ($p \leq 0,001$) відносно негативного контролю за t-критерієм Стюдента; ^d – статистична достовірність ($p \leq 0,002$) відносно негативного контролю за t-критерієм Стюдента.

Додаток В

Список публікацій здобувача

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.
2. Баглей Е.А., Недопитанская Н.Н., Решавская Е.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.
3. Баглей Е.А., **Лисовская В.С.**, Недопитанская Н.Н.. Особенности влияния карбендазима на эндокринную систему и пубертантное развитие крыс самцов. *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*. 2015. №3(71). С. 34–47.
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.
5. **Лісовська В.С.**, Жмінько 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.
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. Том 1(150). С. 152–156.
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. Том 2(154). С. 130–135.
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.

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. N7. Том LXXI. С. 1274-81. <http://wl.medlist.org/2018/12/02/07-2018-13>.

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

11. **Лісовська В.С.** Патоморфологічна характеристика пухлин щитовидної залози білих нелінійних щурів. Тези доповідей науково-практичної конференції "Організація токсикологічної допомоги в Україні" (20-21 травня 2002). Київ. 2002. С. 23–26.

12. **Lisovska V.**, Shulyak V., Nedoputanska N. Carbendazim administration to the blood system of rats. Abstracts of the 42nd CONGRESS of EUROPEAN SOCIETIES of TOXICOLOGY. Cracov, 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: мат. VIII міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини». 2007. С. 28-29.

14. Bagley E. Tumor promotion activity of pesticides/ Bagley E., Reshavska E, Nedopitanska N., **Lisovska V.** 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/ **Viktoriia Lisovska**. 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. Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.466>.

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 – Science providing solutions. Helsinki, Finland 8th –11th of September. 2019. P.4–5.

Додаток Г

Апробація результатів 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.); I 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.).

Додаток Д

Акти впровадження результатів дослідження



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Комісія з питань державної санітарно-епідеміологічної експертизи пестицидів та агрохімікатів

при Головному державному санітарному лікареві України

№ 387/2 від 03.06.2019

ВИСНОВОК

Комісії з питань державної санітарно-епідеміологічної експертизи пестицидів та агрохімікатів

Матеріали досліджень на тему: «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму» Лісовської В.С., проведених як фрагмент досліджень на виконання умов експериментальної реєстрації препаратів Колфуго Супер, к.с. (карбендазим, 200 г/л) та Колфуго Дуплет, КС (карбендазим, 200 г/л + карбоксин, 170 г/л), ураховані під час державної санітарно-епідеміологічної експертизи реєстраційних матеріалів фунгіцидів, за результатами якої видано відповідні висновки від 24.12.2003 р. №05.03.02-05/370 та №05.03.02-05/362 та погоджено їх включення до «Переліку пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні» зі статусом «постійна реєстрація». Результати досліджень також ураховані під час державної санітарно-епідеміологічної експертизи реєстраційних матеріалів ряду інших генеричних фунгіцидів, а саме: Абсолют, КС (карбендазим, 500 г/л), висновок від 06.08.2019 р. №12.2-18-6/17463; Штефозал, КС (карбендазим, 500 г/л), висновок від 06.08.2019 р. №12.2-18-6/17455; Дезарал Екстра, КС (карбендазим, 250 г/л + флутріафол, 125 г/л), висновок від 06.08.2019 р. №12.2-18-6/17392;

Заступник голови Комісії

Заступник голови Комісії

Вчений секретар Комісії

Бардов В.Г.

Проданчук М.Г.

Недопитанська Н.М.

Голова Комісії –
академік НАН та
НАМН України,
проф.Ю.І.Кундієв
Інститут медицини
праці НАМН України
Тел.(044)2843427

Заступник голови
Комісії – член-кор.
НАМН України,
проф.В.Г.Бардов
Інститут гігієни та
екології Національного
медичного університету
імені О.О. Богомольця
Тел.(044)4838345

Заступник голови
Комісії – член-кор.
НАМН України,
проф.М.Г.Проданчук
Науковий центр
превентивної
токсикології, харчової
та хімічної безпеки
імені академіка
Л.І. Медведя
Міністерства охорони
здоров'я України
Тел.(044)5269700

Вчений секретар Комісії
– к.б.н. Недопитанська
Н.М.

Науковий центр
превентивної
токсикології, харчової
та хімічної безпеки
імені академіка
Л.І. Медведя
Міністерства охорони
здоров'я України
Тел.(044)2597628
E-mail:
utox.medved@gmail.com



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
КОМІТЕТ З ПИТАНЬ ГІГІЄНИЧНОГО РЕГЛАМЕНТУВАННЯ

01033, м. Київ, вул. Саксаганського, 75, телефон (044) 289-36-43, E-mail: info@uhrc.gov.ua;
web:<http://w.w.w.uhrc.gov.ua>

03.12.19 № 473

На № _____ від _____

Заступнику директора
ДП «Науковий центр
превентивної токсикології,
харчової та хімічної
безпеки імені академіка
Л.І. Медведя Міністерства
охорони здоров'я України»
Бережнову С.П.

Висновок

Дослідження Лісовської В.С. на тему: «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму», проведені на виконання умов експериментальної реєстрації фунгіцидів Колфуго Супер, к.с. (карбендазим, 200 г/л) та Колфуго Дуплет, КС (карбендазим, 200 г/л + карбоксин, 170 г/л), ураховані також під час токсиколого-гігієнічної оцінки та регламентації умов безпечного застосування ряду генеричних карбендазим-містких фунгіцидів, а саме: Абсолют, КС (карбендазим, 500 г/л), Штефозал, КС (карбендазим, 500 г/л), та Дезарал Екстра, КС (карбендазим, 250 г/л + флутріафол, 125 г/л).

Директор

Р.В. Коваль

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Наукового центру превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України
член-кор. НАМН України, професор
М.Г. Проданчук

« 14 » _____ 2013 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ**1. Назва запропонованого методу для впровадження:**

Вивчення ініціюючих та/або промоторних властивостей хімічних речовин (пестицидів-генериків) на моделі «НДЕА-гепатектомія»

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» (м. Київ – 03127, вул. Героїв Оборони, 6), пр.наук.с., к.біол.н Н.М. Недопитанська, н.с. О.В.Решавська, н.с. В.С.Лісовська, пр.наук.с., д.мед.н, Є.А.Баглій

3. Джерело інформації:

IARC Scientific Publication. Medium-term bioassays for carcinogens. Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification. Ito N., T.Shirai, R.Hasegawa. Lyon: 1992. 116.

4. Де і коли впроваджено:

Відділ токсикології та медико-біологічних досліджень ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», 2013

5. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

Дослідження канцерогенних властивостей карбендазиму та інших діючих речовин пестицидів

6. Ефективність впровадження:

Впроваджений методологічний підхід дозволяє визначити ініціюючу та/або промоторну дію хімічних речовин при ідентифікації їх канцерогенності. Доцільність використання запропонованої методики полягає у суттєвому прискоренні термінів отримання результатів у порівнянні з хронічними дослідженнями та скороченні на порядок кількості лабораторних тварин, що відповідає вимогам біоетики

7. Зауваження та пропозиції:

Немає

Відповідальний за впровадження:

Кер. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень д.біол.н.
Пр.наук.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень д.мед.н.
Пр.наук.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень к.біол.н.
Н.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень
Н.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень

« 14 » _____ 02 _____ 2013 р.

П.Г. Жмілько

Є.А. Баглій

Н.М. Недопитанська

О.В.Решавська

В.С. Лісовська

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Наукового центру превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України
член-кор. НАМН України, професор
М.Г. Проданчук

« 03 » _____ 2014 р.

**АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ****1. Назва запропонованого методу для впровадження:**

Вивчення антитиреоїдного, антиандрогенного/андрогенного ефекту хімічних речовин (пестицидів-генериків) з гормональним механізмом канцерогенезу у щурів самців

2. Ким запропоновано, адреса, виконавці:

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» (м. Київ – 03127, вул. Героїв Оборони, 6), н.с. В.С.Лісовська, пр.наук.с., к.біол.н. Н.М.Недопитанська, пр.наук.с., д.мед.н Є.А.Баглій

3. Джерело інформації:

U.S. Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program, OCSPP Guideline 890.1500, Pubertal Development and Thyroid Function in Intact Juvenile /Peripubertal Male Rats Assay, August 2011

4. Де і коли впроваджено:

Відділ токсикології та медико-біологічних досліджень ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», 2014

5. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

Дослідження канцерогенності карбендазіму та інших діючих речовин пестицидів

6. Ефективність впровадження:

Впроваджений методологічний підхід дозволяє ідентифікувати канцерогенність хімічних речовин із властивостями ендокринних дизрапторів (антитиреоїдними, антиандрогенними/андрогенними) з механізмом дії, що полягає у розладах гормонального балансу. Доцільність використання запропонованої методики полягає у високій інформативності, суттєвому прискоренні термінів отримання результатів щодо канцерогенності у порівнянні з хронічними дослідженнями та скороченні на порядок кількості лабораторних тварин, що відповідає вимогам біоетики

7. Зауваження та пропозиції:

Немає

Відповідальний за впровадження:

Кер. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень д.біол.н.
Пр.наук.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень д.мед.н.
Пр.наук.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень к.біол.н
Н.с. відділу токсикології та медико-біологічних досліджень

« 03 » _____ 2014 р.

П.Г. Жмілько

Є.А. Баглій

Н.М. Недопитанська

В.С. Лісовська

Начальник Української
військово-медичної академії
д.мед.н. професор полковник м/с



В. САВИЦЬКИЙ

20 19 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму».
2. **Установа, автори:** ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», відділ «Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень», науковий співробітник Лісовська Вікторія Семенівна.
3. **Джерела інформації:** Лісовська В.С., Недопитанська Н.М., Решавська О.В., Терещенко Н.В., Баглий Є.А. Ідентифікація канцерогенності карбендазиму: експериментальне дослідження на мишах лінії СВА. *Український журнал сучасних проблем токсикології*. 2019. №3(87). С. 18–23
4. **Де та коли впроваджено:** у навчальний матеріал програми спеціалізації за спеціальністю «Токсикологія» кафедри військової токсикології, радіології та медичного захисту Української військово-медичної академії впродовж 2019–2020 навчального років.
5. **Результати впровадження:** використання результатів дослідження у навчальному процесі та науковій роботі дозволяє поглибити знання про механізми токсичності (канцерогенності) пестицидів групи бензімідазолів, зокрема карбендазиму.
6. **Термін впровадження:** 2019–2020 рр.
7. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра військової токсикології, радіології та медичного захисту Української військово-медичної академії.

Начальник кафедри військової токсикології,
радіології та медичного захисту УВМА
д.мед.н., професор, полковник м/с

Л. УСТИНОВА

Старший викладач кафедри військової токсикології,
радіології та медичного захисту УВМА
працівник ЗС

О.СВТОДЬЄВ

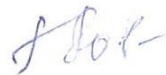
Головний лікар Київської
міської клінічної лікарні
швидкої медичної допомоги
 О.А. Ткаченко
«15» _____ 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до лікувально-діагностичного процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму».
2. **Установа, автори:** ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України», відділ «Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень», науковий співробітник Лісовська Вікторія Семенівна.
3. **Джерела інформації:**
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
Лісовська В.С., Жмілько 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. 4.
Де та коли впроваджено: у лікувально-діагностичний процес підрозділів токсикологічного профілю лікарні (токсикологічної лабораторії, відділення токсикології, відділення інтенсивної терапії та екстракорпоральної детоксикації) впродовж 2019–2020 років.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів дослідження у лікувально-діагностичному процесі на науковій роботі дозволяє поглибити знання про механізми токсичності (канцерогенності) пестицидів групи бензімідазолів, зокрема карбендазиму.
6. **Термін впровадження:** 2019–2020 рр.
7. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Київська міська клінічна лікарня швидкої медичної допомоги.

Заступник головного лікаря з
організаційно-методичної роботи



Н.Ф. Гайворонська

Завідувач токсикологічної лабораторії



Л.Т. Лукашевич