

ВІДГУК

офіційного опонента професора кафедри екології та зоології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка д.б.н., проф. Л.В.Гарманчук на дисертаційну роботу Лісовської Вікторії Семенівни «ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ КАНЦЕРОГЕННОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ», подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.06 –

токсикологія

1. Актуальність теми дисертації. Дисертаційна робота В.С. Лісовської присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми, пов'язаної з визначенням потенційної канцерогенної дії карбендазиму (метил-1*H*-бензімідазол-2-іл-карбамат) з вираженими властивостями фунгіциду, що широко використовується для захисту рослин, обробки продукції для довготривалого зберігання, а також в якості біоциду у різних галузях промисловості. Карбендазим відносять до антитубулінових препаратів, так як взаємодіючи з β -тубуліном даний засіб пригнічує полімеризацію мікротрубочок, що призводить до порушення сегрегації хромосом під час поділу клітин з подальшою загибеллю клітин. Карбендазим достатньо стійкий забруднювач довкілля і має виражений токсикологічний ефект на живі організми як прямий, так і опосередкований через накопичення в продуктах харчування та воді. Незважаючи на незначну гостру токсичність карбендазиму, його накопичення в організмі і пролонгована дія викликає такі побічні ефекти як генотоксичність, гематотоксичність, ембріотоксичність і т.д. Виражена цитотоксичність карбендазиму та його здатність індукувати мітотичну катастрофу (як один із механізмів апоптичної загибелі клітин) викликає зацікавленість щодо використання даного засобу в якості протипухлинного препарату, водночас, нечисленні дослідження вказують на канцерогенний ефект карбендазиму відносно нормальних клітин. Отже,

питання щодо прямої канцерогенної дії карбендазиму залишається відкритим і є актуальним науково-практичним завданням сучасної токсикології.

У дисертаційній роботі Лісовської В.С. представлені результати експериментальних досліджень канцерогенної дії карбендазиму в експериментах *in vivo* та виявлено як його онкогенні ефекти опосередковано через ендокринну систему, так і промоторну дію.

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України»: «Наукове обґрунтування методології державної санітарно-гігієнічної експертизи, її нормативно-правового та інформаційного забезпечення» державний реєстраційний №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» державний реєстраційний №0100U000254, №0112U001133.

2. **Наукова новизна роботи** полягає у визначенні канцерогенних властивостей карбендазиму на різних моделях в умовах хронічного, коротко- і середньострокових експериментів отримано нові експериментальні дані, що доповнюють та розширюють наукове розуміння характеру потенційної канцерогенності досліджуваної речовини. У щурів лінії Wistar в хронічному експерименті виявлено збільшення лейдигом у самців; пухлин гіпофізу, щитоподібної і молочної залози у самиць. У мишей лінії СВА не виявлено канцерогенної дії карбендазиму. Встановлена здатність карбендазиму проявляти цитотоксичну і анемізуючу дію при надходженні у високих дозах, спричиняти кількісні і морфологічні зміни лейкоцитів, 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. Уперше встановлені промоторні властивості карбендазиму на нітрозодидетиламін-ініційованих гепатоцитах щурів самців Wistar на моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА-гепатектомія».

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Результати дисертаційної роботи щодо канцерогенності генеричного карбендазиму використані для оцінки потенційної небезпеки його для людини, при обґрунтуванні гігієнічних нормативів і регламентів безпечного використання у сільському господарстві препаратів на основі карбендазиму (зокрема Колфуго Супер і Колфуго Дуплет) та вирішення питання щодо їх реєстрації в Україні (висновки від 24.12.2003 р. №05.03.02-05/370 та №05.03.02-05/362). Впроваджено у практику Наукового центру превентивної токсикології нові підходи щодо ідентифікації канцерогенності пестицидів-генериків, які порушують гормональний баланс, що полягає у використанні методики, рекомендованої у якості скринінгового тесту у батареї досліджень 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).

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних методів токсикологічної оцінки канцерогенної та токсичної дії фунгіциду широкого спектру дії – карбендазиму, включно з токсикологічними, фізіологічними, паторфологічними, гістохімічними, морфологічними, морфометричними, гематологічними, цитохімічними методами. Отримані результати

проаналізовано за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам для підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.

Дисертацію побудовано за традиційним планом. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. На початку роботи наведено перелік використаних позначень та скорочень. Текст із переліком літератури (228 першоджерел, із них 198 латиницею), ілюстраціями (18 рисунків та 23 таблиці) викладено українською мовою на 170 сторінках комп'ютерного тексту.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; мета і задачі дослідження; дано визначення об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукова новизна та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації; публікації, а також про структуру та обсяг дисертації.

Розділ 1 присвячений огляду літератури, у якому розглянуто аспекти біологічної активності, токсичні та канцерогенні властивості карбендазиму. Огляд складається з 4 підрозділів, у першому з яких надано загальну характеристику речовин бензімідазольного ряду, карбендазиму зокрема. Другий підрозділ присвячений токсикологічній характеристиці, метаболізму та механізму біологічної і фунгіцидної дії карбендазиму. У третьому підрозділі викладено матеріал щодо токсичної дії карбендазиму на організм ссавців. У підсумковому четвертому підрозділі огляду літератури

проаналізовано генотоксичні, цитотоксичні та канцерогенні ефекти карбендазиму. Варто зазначити, що автором надані останні експериментальні дані з питань, що стосуються теми дисертації. Підсумовуючи огляд літератури, дисертанткою зазначено, що 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 поодинокі та розрізнені 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.

Незважаючи на високий рівень та критичний аналіз наведеного літературного огляду, слід зазначити наявний недолік.

Зокрема:

- у підрозділі 1.4 незрозуміло щодо схеми можливого взаємозв'язку між відомими на сьогодні молекулярними механізмами впливу карбендазиму на білки та ДНК і канцерогенезом, наведеній на рис.1.1: це Ваші власні передбачення чи можливо запозичені у інших авторів?

В цілому, огляд літературних даних свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення

до опублікованих результатів, здатність виокремлювати та узагальнювати головне з масиву розрізаних літературних відомостей, чітко викласти стан та перспективи власного дослідження в рамках дисертаційної роботи.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» згруповано за 2 підрозділами, де наведено експериментальні моделі, методичні підходи та схеми досліджень. Також зазначено біоетичні норми та принципи проведення токсикологічних досліджень на експериментальних моделях тварин, в тому числі з індукованими патологіями. Також наведено методи гістохімічного та гістологічного аналізу тканин за введення експериментальним тваринам карбендазиму. Автором детально представлено схеми експериментів, групи тварин, які було використано в експериментальних моделях для визначення токсикологічних ефектів в експериментах гострої та хронічної токсичності. Описані гематологічні, біохімічні показники.

При аналізі даного розділу виявлено деякі недоліки та виникли зауваження:

- варто було б зазначати не просто на щурах Wistar мишах CBA, а щурах лінії Wistar, мишах лінії CBA;
- в загальній схемі дизайну експерименту доцільним було б назвати не «Вплив карбендазиму на показники крові в умовах гострого і хронічного експерименту», а «Визначення/оцінка впливу карбендазиму на показники крові в умовах гострого/хронічного експерименту»;
- при описанні методів визначення деяких показників не розписані методики або ж не містяться посилання;
- надзвичайно важко сприймається експериментальна модель гепатоканцерогенезу, індукована введенням нітрозодіетиламіну (НДЕА), що використовується в якості ініціатора гепатоканцерогенезу. Наскільки відомо, поява пухлин за цієї експериментальної моделі відбувається через 4 місяці (це як мінімум 16 тижнів). І чому Ви проводили ще і часткову гепатектомію?

У розділі 3 наведено результати вивчення канцерогенності карбендазиму в умовах хронічного експерименту на двох видах лабораторних тварин, щурах породи Wistar та мишах лінії СВА.

Автором зазначається, що не виявлено змін в різних органах щурів Wistar за дії карбендазиму, окрім появи деструктивно-атрофічні змін у щурів-самців, частота яких збільшувалася залежно від підвищення дози. Зазначено, що у тварин, які отримували карбендазим у дозах 25 і 75 мг/кг, зміни в сім'яниках виявлялись у 30 % і 44 % тварин відповідно. Достовірне збільшення кількості пухлин встановлено у щурів-самиць, які отримували карбендазим в дозі 5 і 25 мг/кг у порівнянні з негативним контролем ($p \leq 0,05$). Між частотою злоякісних новоутворень, виявлених у піддослідних і контрольних тварин, не встановлено статистично достовірної різниці.

- Як Ви можете пояснити результати щодо виживаності тварин в контрольній та дослідних групах? Дані таблиці 3.1 свідчать що «смертність тварин упродовж експерименту у контрольній групі як самців, так і самиць була вищою у порівнянні з піддослідними»

- Які захворювання Ви відносите до «непухлинної патології»?

В результатах щодо виникнення пухлин зазначено, що «достовірне збільшення кількості пухлин встановлено у щурів самиць, які отримували карбендазим у дозі 5 і 25 мг/кг у порівнянні з негативним контролем. І далі вказується «між частотою злоякісних новоутворень, виявлених у піддослідних і контрольних тварин, не встановлено статистично достовірної різниці» Як Ви це можете пояснити?

-Зазначено, що «зростання частоти новоутворень щитоподібної залози у тварин спостерігалось у чіткій зворотній прогресії – чим менша доза, тим більший ефект» - чому така залежність?

- При описанні терміну виникнення пухлин у піддослідних та контрольних тварин зазначається, що «час виявлення першої пухлини є подібним у піддослідних і контрольній групах» варто було б перефразувати – «час виникнення поодиноких пухлин»....

- Чому різний термін тривалості експерименту щодо вивчення канцерогенності карбендазиму у щурів та мишей?

Розділ 3 підсумовується основним висновком, який вказує лише на одну характерну дію карбендазиму, що при аналізі «кількісної оцінки спектру пухлин у всіх піддослідних групах (стосується щурів лінії Wistar) встановлено збільшення частоти гормонозалежних пухлин». Решта висновків вказує на те, що «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 спектру виявлених пухлин у тварин, які отримували карбендазим, не зазначено. Не виявлено новоутворень, які є не характерними для щурів Wistar». Чи співставні Ваші результати з даними інших авторів, що досліджували канцерогенність сполук, подібних карбендазиму? Що стосується впливу карбендазиму на мишей лінії СВА, то достовірної різниці між контрольними тваринами та піддослідними за введення всіх доз змін не виявлено.

Оскільки, основним механізмом токсичної дії карбендазиму є цитотоксичні і генотоксичні ефекти спричинені порушенням утворення веретена поділу при мітозі, то одним із механізмів можуть бути порушення мітотичної активності клітин-попередників у кістковому мозку, а також вплив на імунний статус організму. Тому, автором висувається наступне завдання, яке досліджується в **розділі 4** присвяченому впливу карбендазиму на систему крові щурів Wistar. За умов експерименту за визначення гострої токсичності карбендазиму гематологічні показники щурів самців Wistar відрізнялись від показників в контролі залежно від терміну дослідження в період від 1 доби до 21 доби; так було встановлено, що карбендазим при одноразовому пероральному надходженні в організм щурів самців у дозі 750 мг/кг призводить до зменшення кількості клітин еритроїдного ряду, а саме ретикулоцитів (1 і 3 доба експерименту). Не зважаючи на відповідні відновні і регенеративні процеси клітин еритроїдного ряду (ретикулоцитоз та

поліхроматофілію), кількість еритроцитів та рівень гемоглобіну в крові тварин на кінець гострого експерименту залишилися зниженими.

Екстраполюючи отримані результати на концентрацію карбендазиму, що може попадати в організм людини із довкілля, чи є підстава стверджувати щодо його гострої токсичності?

Щодо 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. Можливо буде повторення в запитанні, однак варто уточнити, які дози карбендазиму або його метаболітів можуть попадати в організм людини із довкілля? І які токсикологічні ефекти карбендазиму щодо системи крові варто очікувати у людини?

Розділ 5 присвячено вивченню можливих механізмів онкогенного потенціалу карбендазиму. Незважаючи на значну кількість визначених показників, механізми канцерогенної дії карбендазиму у повній мірі залишаються недоведеними та дискусійними. Гепатоканцерогенність карбендазиму без прямих доказів генотоксичності, а саме відсутності даних щодо індукції анеуплоїдій в органі-мішені дозволяє припустити промоторні властивості речовини. На думку автора, репродуктивна токсичність карбендазиму та вплив на рівень багатьох гормонів, в тому числі тестостерон, лютеїнізуючий та фолікулоstimулюючий гормон можуть сприяти зміні гормонального фону в організмі та стати причиною розвитку неоплазій. Автором запропоновано цікаву модель при визначенні впливу карбендазиму на гормональний статус організму ссавців, а саме модель пубертатного розвитку самців щурів Wistar. Експеримент проведено на ювенільних щурах-самцях лінії Wistar при дії карбендазиму у дозі 0, 10 і 75 мг/кг маси тіла. За дії карбендазиму в дозі 75 мг/кг встановлено зниження маси тіла (зокрема на момент статевого дозрівання) і приросту маси тіла. Виявлено збільшення абсолютної та відносної маси гіпофізу, надниркових залоз, абсолютної маси епідидимісів та зменшення абсолютної маси сім'яників. Окрім цього, встановлено достовірну кореляцію між змінами

маси «гіпофіз-сім'яники» і «гіпофіз-наднирники». За результатами гістоморфологічних досліджень у тварин цієї групи виявлено деструктивно-атрофічні зміни у сім'яниках та епідидимісах.

На моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА-гепатектомія» не виявлено властивостей карбендазиму як класичного промотора канцерогенезу. Однак, зазначається зміна в активності гамма-глутамілтрансферази за дії карбендазиму в середній експериментальній дозі. А чи не пов'язано це зі зміною антиоксидантних властивостей, активацією глутатіонової системи як механізму захисту від нерозчинних токсичних метаболітів карбендазиму?

Виникає запитання до автора, чи можна стверджувати в цілому про виражені канцерогенні властивості карбендазиму? Тим більше, що деякими авторами пропонуються речовини даного класу для використання в якості протипухлинних, зважаючи на їх проапоптичну дію, пов'язану з пригніченням полімеризації тубуліну?

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» детально аналізуються отримані результати щодо токсичних та канцерогенних ефектів карбендазиму на організм експериментальних тварин. В даному розділі автор піддає детальному та критичному аналізу результати власних досліджень, аналізує їх із практичних точок зору та в порівнянні з даними літератури, висловлює власні припущення щодо онкогенної дії та промоторних властивостей карбендазиму. Автором зроблено припущення, що карбендазим може діяти через епігенетичний механізм, як промотор трансформації клітин, так і безпосередньо, як інгібітор проліферації клітин, блокуючи мітоз та індукуючи апоптоз. Можливо, саме тому не проявляється дозозалежність при виникненні пухлин тої або іншої локалізації. Також автором зазначається, що екстраполяція при визначенні канцерогенної небезпеки ксенобіотиків для людини за результатами досліджень на експериментальних тваринах не може бути в повній мірі доказовою. Однак, накопичення ксенобіотиків з токсичними ефектами в довкіллі, тим паче таких, які довго і не повній мірі

піддаються протеолізу створює небезпеку для здоров'я та життя живих організмів, і в тому числі для людини.

Можливо в даному аспекті варто було б наголосити автором про так званий «пролонгований» (накопичувальний токсикологічний ефект) карбендазиму?

І також, що Ви думаєте про перспективи Ваших досліджень? Чи перейде Україна в число тих держав, в яких заборонять використання фунгіцидів до яких віднесено карбендазим (метил-1Н-бензімідазол-2-іл-карбамат)?

Наведені висновки відповідають меті та завданням, поставленим автором, проте дещо переобтяжені цифрами.

Перелік використаних джерел літератури містить 228 посилань українською та іноземними мовами, переважна більшість яких опублікована в останні 10 років.

Таким чином, дисертація Лісовської Вікторії Семенівни «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних форумах та з'їздах. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано в 17 наукових працях: 9 статей (1 проблемна та 2 методично-експериментальні, що додатково відображають наукові результати дисертації), 3 з яких у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 6 у фахових наукових виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами даних, 8 тез доповідей.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної

проблеми, на які спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і формлення.

За позитивної оцінки, проведеної автором роботи можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації, таких як присутність в тексті дисертації мовних неточностей, русизмів, описок та невдалих перекладів з англійської мови.

Більшість із недоліків та запитань було прокоментовано при аналізі розділів дисертаційної роботи, тому не вважаю за доцільне зупинятись на цих питаннях та зауваженнях повторно.

Однак наведені недоліки та зауваження не знижують загального позитивного враження про роботу і дисертація Лісовської Вікторії Семенівни «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму» в цілому є завершеним актуальним самостійним дослідженням, виконаним на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та відповідністю висновків поставленим завданням. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Автореферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює її зміст.

8. **Відповідність дисертації встановленим вимогам.** Дисертаційна робота Лісовської Вікторії Семенівни «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму» є самостійною, завершеною науковою працею, містить нове вирішення важливого науково-практичного завдання сучасної токсикології – вивчення та характеристика небезпеки канцерогенності карбендазиму на різних експериментальних моделях в умовах хронічного, коротко- та середньострокових експериментів.

Результати роботи мають науково-теоретичне і практичне значення. Наукові положення, висунуті автором, та отримані результати мають суттєве значення для превентивної токсикології.

Таким чином, дисертаційна робота Лісовської Вікторії Семенівни за актуальністю проблеми, методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною отриманих результатів, обґрунтованістю висновків, теоретичною та практичною значимістю, відповідає вимогам пп. 9 та 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присвоєння йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.06 – токсикологія.

Професор кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка д.б.н., проф.

Л.В.Гарманчук

Підпис проф. Л.В.Гарманчук

Засвідчую

