

ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника Пихтєєвої Олени Гераклівни на дисертаційну роботу Лісовської Вікторії Семенівни на тему: «ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ КАНЦЕРОГЕННОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ», подану до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.03.06 — токсикологія

Актуальність теми дисертації.

Використання пестицидів у сільському господарстві різних країн щороку зростає, що, безумовно, не може не впливати на здоров'я населення впродовж кількох поколінь. Так, за думкою експертів Міжнародної агенції з вивчення раку (IARC), хімічні речовини (зокрема, пестициди) можуть бути основною прямою чи опосередкованою причиною збільшення онкологічних захворювань. Так в Україні впродовж 2018 року виявлено 169 817 нових випадків захворювань на рак (WHO, 2019).

Карбендазим [N- (бензімідазоліл-2)-О-метілкарбамат] — діюча речовина пестицидів з класу бензімідазолів, один з перших системних фунгіцидів, який використовується і в даний час. На сьогодні в Україні зареєстровано та використовується 26 препаратів на його основі. Тривалий час зберігання в ґрунті, у водному середовищі та значні обсяги виробництва вимагають докладного вивчення потенційної канцерогенності пестицидного препарату карбендазиму та з'ясування можливих механізмів реалізації його онкогенної дії, що обумовлює **актуальність** дисертаційного дослідження.

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).

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій. Авторкою чітко сформульовані мета і задачі дослідження, а для їх вирішення проведено комплексне дослідження з використанням експериментальних токсикологічних, фізіологічних, патоморфологічних, гістоморфологічних, гематологічних, цитохімічних, гістохімічних, морфометричних методів. Для оцінки результатів застосовували параметричні та непараметричні методи статистики. Робота виконана на різних біологічних моделях. 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; 855 показників ендокриндизрапторної дії та 300 — промоторної дії. Методично вірний підхід до вирішення поставлених експериментальних задач забезпечив достовірність та репрезентативність отриманих автором наукових результатів та дав змогу одержати нові наукові дані, які мають важливе теоретичне і практичне значення. Авторкою була цілком досягнена мета даної роботи — в експериментальних умовах було визначено особливості канцерогенної дії карбендазиму та встановлені можливі механізми реалізації його онкогенного потенціалу.

Новизна досліджень і одержаних результатів не викликають сумнівів. Більше ніж сорокарічне вивчення карбендазиму (зокрема його мутагенних та канцерогенних властивостей) в світі призвело до наявності суперечливих даних. Уперше авторка в умовах хронічного, коротко- і середньострокових експериментів отримала нові дані щодо канцерогенності генеричного карбендазиму. Вперше було 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

встановлено 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». Вперше показано ендокриндизрапторну дію карбендазиму на ювенільних щурах самцях Wistar та встановлені промоторні властивості карбендазиму на нітрозодietiетиламін-ініційованих гепатоцитах щурів-самців Wistar на моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА-гепатектомія».

Практичне значення одержаних результатів полягає у використанні отриманих даних щодо канцерогенності генеричного карбендазиму 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 до ідентифікації канцерогенності пестицидів-генериків, що порушують гормональний баланс, мають промоторні властивості, про що свідчать Акти впровадження (додаток Д).

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях та у авторефераті підтверджується їх співставленням з текстом дисертації, кількісними та якісними характеристиками опублікованих 17 наукових праць, зокрема 9 статей 3 з яких у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 6 у фахових наукових виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами даних (Google Scholar, Index Copernicus, PubMed/Medline, SCOPUS), 8 тез доповідей у матеріалах з'їздів, наукових конференцій, зокрема міжнародних. Опубліковані праці та автореферат повністю відображають наукові положення, що викладені в дисертації та ідентичні з текстом дисертації за змістовними атрибутами.

Структура і зміст дисертації. Робота побудована за традиційною класичною схемою, складається із анотації, вступу, огляду літератури,

матеріалів та методів, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та п'яти додатків. Дисертація викладена українською мовою на 170 сторінках комп'ютерного тексту. Обсяг основного тексту складає 128 сторінок. Дисертація ілюстрована 18 рисунками, 23 таблицями.

«Анотація» написана українською та англійською мовами згідно з встановленою формою для дисертаційних робіт. Містить основні результати досліджень, наукову новизну, практичну значимість та список публікацій здобувача.

«Вступ» відповідає вимогам діючої форми і надає загальне уявлення про актуальність вивчення особливостей канцерогенної дії карбендазиму та з'ясування можливих механізмів реалізації його онкогенного потенціалу, оскільки пестициди на основі карбендазиму широко використовуються у багатьох країнах світу, у тому числі в Україні. Обґрунтовано необхідність проведення даного дослідження, чітко сформульовано мету і основні завдання, а також вказана наукова новизна, практичне значення тощо.

Розділ 1 «Біологічна активність, токсичні та канцерогенні властивості карбендазиму» є проведеним на високому рівні аналітичним оглядом літератури щодо сучасного стану проблеми в світі. Розділ складається з чотирьох підрозділів: 1. Загальна характеристика та поведінка речовин бензімідазольного ряду в об'єктах навколишнього середовища; 2. Токсикологічна характеристика, метаболізм, механізм біологічної і фунгіцидної дії карбендазиму; 3. Особливості токсичної дії карбендазиму на організм ссавців; 4. Генотоксичні, цитотоксичні та канцерогенні ефекти карбендазиму. Аналітичний огляд літератури демонструє широку ерудицію авторки та показує вміння знаходити і аналізувати сучасні дані світової науки і практики щодо вирішуваних завдань.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» показує концептуальний підхід до оцінки канцерогенності генеричного 98 % карбендазиму, який передбачав застосування комплексу експериментальних токсикологічних, фізіологічних, патоморфологічних, гістоморфологічних, гематологічних, цитохімічних, гістохімічних, морфометричних методів в умовах хронічного, гострого та середньострокового експериментів на 2 видах тварин різного віку

та включав: 1 — блок досліджень канцерогенності карбендазиму, 2 — блок оцінки впливу карбендазиму на показники крові в умовах гострого і хронічного експерименту, 3 — блок експериментальних досліджень ендокриндизрапторної дії карбендазиму, 4 — блок досліджень промоторних властивостей карбендазиму. Такий застосований у роботі комплексний підхід є безумовною перевагою виконаної роботи.

Розділ 3 присвячений вивченню канцерогенності карбендазиму в умовах хронічного експерименту на двох видах лабораторних тварин (щури породи *Wistar* і миші лінії *CBA*). Дослідження і аналіз їх результатів проведені на високому науково-практичному рівні. Показано, що за умов хронічного перорального надходження карбендазиму до організму самців і самиць щурів *Wistar* упродовж 104 тижнів загинуло 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 та 25 мг/кг, гіпофізу — 75 мг/кг; у самців збільшення частоти лейдигоклітинних пухлин діагностовано в дозі 25 мг/кг. Встановлена відсутність статистично достовірної різниці між частотою злоякісних пухлин, виявлених 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. Кількість доброякісних пухлин перевищувала чисельність злоякісних. Показано, що час виявлення першої пухлини та середнього латентного періоду розвитку пухлини та середній термін життя 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 впливом карбендазиму та не виходять за межі фізіологічних коливань контрольних тварин.

За умов хронічного перорального надходження карбендазиму до організму самців і самиць мишей лінії СВА впродовж 78 тижнів загибелі тварин, що пов'язана з дією речовини, не встановлено. Якісних відмінностей гістоморфологічного спектру 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. Середня тривалість життя 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.

Розділ 4 присвячений вивченню впливу карбендазиму на систему крові щурів *Wistar* за умов гострої та хронічної пероральної інтоксикації різними дозами. Вікторія Семенівна показала, що відбувається зменшення чисельності формених елементів периферичної крові за дії карбендазиму в дозі 750 мг/кг, яке, ймовірно, пов'язане з пригніченням гемопоезу та цитотоксичним впливом препарату. Незважаючи на відповідні відновні та регенеративні процеси клітин еритроїдного ряду, що спостерігалися впродовж експерименту, 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.

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.

Розділ 5 присвячений аналізу можливих механізмів онкогенного потенціалу карбендазиму. Проведені дослідження ендокриндизрапторних властивостей карбендазиму на ювенільних/передпубертатних щурах-самцях Wistar при введенні карбендазиму в дозах 0, 10 і 75 мг/кг маси тіла протягом 30 діб. Показано, що дозозалежні 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 змін в організмі тварин і можуть свідчити про ендокриндизрапторну дію карбендазиму.

Грамотно спланований експеримент з наявністю негативного контролю (розчинник) та позитивного контролю (фенобарбітал як класичний промотор)

при дії доз 25, 75, 300 мг/кг з дослідження промоторної активності карбендазиму за умов середньострокової пероральної інтоксикації на моделі гепатоканцерогенезу «НДЕА-гепатектомія» дозволив показати, що в щурів, які отримували нижчу дозу речовини, відбувається підвищення активності маркерного фермента переднеопластичних популяцій гепатоцитів гамма-глутамілтрансферази. Досліджувані параметри у вищій дозі були наближеними до контрольних показників, тобто авторка показала дуже цікаву «парадоксальну» залежність доза-ефект.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» проведений аналіз отриманих результатів, їх порівняння з даними сучасних досліджень та результатами робіт за останні 45 років. Розглянуті численні параметри впливу карбендазиму на практично всі органи і системи організму щурів і мишей. Розділ демонструє широку ерудицію Лісовської Вікторії Семенівни, її вміння аналізувати та узагальнювати отримані дані і співставляти їх з даними літератури.

Висновки відповідають поставленим в роботі завданням, впливають із одержаних результатів, містять нові, важливі в теоретичному і практичному плані положення.

Список використаних джерел оформлений згідно з сучасними вимогами, містить 228 джерел, зокрема 33 — кирилицею, 195 — латиницею.

Додатки (5) включають гістоморфологічний аналіз непухлинної патології щурів *Wistar* та мишей лінії *СВА*, виявленої в хронічному експерименті (Додаток А), Гематологічні показники стану організму самців і самиць щурів (Додаток Б), Список публікацій здобувача (Додаток В), Перелік місць з апробації результатів дисертації (Додаток Г), Акти впровадження результатів дослідження (Додаток Д).

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту і оформленню.

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено дисертаційна робота оформлена згідно з сучасними вимогами ДАК України, прекрасно ілюстрована мікрофотографіями. Разом з тим, виникли зауваження та запитання дискусійного характеру.

Зауваження.

1. В тексті дисертації немає номера CAS карбендазиму, що затруднює порівняння отриманих результатів з даними міжнародних досліджень (CAS Number: 10605-21-7).
2. У тексті зустрічаються громіздкі вирази, на кшталт «Отримані результати за сумарною частотою дисгормональних новоутворень у самців вказують на їхнє максимальне збільшення при дії середньої дози, тоді як у самиць простежується зворотна залежність від дози».
3. У розділі 3 таблиця 3.2 досить об'ємна, тому її варто б було подати у вигляді додатків.

Вказані зауваження не мають принципового значення і не впливають на загальну позитивну оцінку дисертації.

Враховуючи великий і різноплановий матеріал дисертації, суттєвий науковий інтерес мають дискусійні запитання, відповіді на які бажано надати в ході офіційного захисту:

1. Які дози може отримати людина при максимально можливому споживанні продукції з вмістом на рівні МДР або при роботі з пестицидом? Як вони співвідносяться з експериментальними дозами? Чи не буде при низьких (на рівні МДР) дозах інший механізм дії і, відповідно, інший ефект?
2. З чим пов'язана видова специфічність канцерогенної дії карбендазиму? Наскільки коректна апроксимація отриманих даних на людину?

Рекомендації щодо використання одержаних в дисертації результатів в практику. 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 батареї альтернативних тестів з ідентифікації канцерогенності генеричних пестицидів.

ВИСНОВОК

Дисертація Лісовської Вікторії Семенівни на тему «Ідентифікація потенційної канцерогенності карбендазиму» є самостійною завершеною науково-дослідною роботою, що містить вирішення актуального і важливого завдання — експериментального встановлення потенційної канцерогенності карбендазиму.

За актуальністю, рівнем наукової новизни та практичним значенням дисертаційна робота Лісовської Вікторії Семенівни відповідає п. 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів» щодо кандидатських дисертацій, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (зі змінами та доповненнями, внесеними згідно з Постановами КМ № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015, № 567 від 27.07.2016, № 943 від 20.11.2019, № 607 від 15.07.2020), а її авторка **заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.03.06 — токсикологія.**

Офіційний опонент

Завідувач лабораторії промислової та екологічної токсикології ДП «Український НДІ медицини транспорту МОЗ України», доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

О.Г.Пихтєєва

Підпис зав. лабораторії промислової та екологічної токсикології д.б.н., с.н.с. О.Г.Пихтєєвої засвідчую:

Вчений секретар ДП «Український НДІ медицини транспорту МОЗ України» к.б.н.



Н.С.Бадюк