

## ДОСЛІДЖЕННЯ АКТУАЛЬНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТУ ДЛЯ ЗАХИСТУ ВОДНОЇ ЕКОСИСТЕМИ ВІД ВПЛИВУ НЕБЕЗПЕЧНИХ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН

Крайнюков О.М.<sup>1</sup>, Деменко А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна  
майд. Свободи, 6, 61022, м. Харків

<sup>2</sup>НДУ «Український науково-дослідний інститут екологічних проблем»  
вул. Бакуліна, 6, 61166, м. Харків  
[alkraynukov@gmail.com](mailto:alkraynukov@gmail.com), [an.v.demenko@gmail.com](mailto:an.v.demenko@gmail.com)

Надходження до поверхневих вод небезпечних хімічних речовин є актуальною проблемою в галузі нормування якості поверхневих вод різних країн. Особливу небезпеку становлять речовини генотоксичної дії. Мета статті – дослідити актуальність використання мікроядерного тесту як інструменту для запобігання генотоксичного впливу небезпечних хімічних речовин на водні екосистеми та здоров'я людини. Для досягнення поставленої мети авторами було проаналізовано останні наукові роботи за визначеною вище тематикою, які представлені в періодичних виданнях на таких платформах, як PubMed, Scopus, Google Scholar, Wiley тощо. На основі останніх світових наукових досягнень було проведено дослідження актуальності використання мікроядерного тесту як інструменту для запобігання генотоксичного впливу небезпечних хімічних речовин на водні екосистеми та здоров'я людини. Незважаючи на те, що цей метод не є новим, зацікавленість наукового співтовариства до нього не згасає. Про це свідчить позитивна динаміка застосування мікроядерного тесту в роботах, опублікованих на платформі PubMed. Мікроядерний тест використовується як у процесі виявлення генотоксичних властивостей окремих хімічних речовин чи сумішей, так і в біомоніторингових дослідженнях поверхневих вод. Основну увагу авторами приділяють зарубіжним і вітчизняним роботам, в яких науковці використовували як тест-організми риб для виявлення генотоксичних властивостей різних хімічних речовин у воді за допомогою мікроядерного тесту. Цей вибір пояснюється наявністю подібної тест-реакції в риб і ссавців, зокрема людини, на вплив небезпечних хімічних речовин. Для підвищення рівня захисту поверхневих водних об'єктів України та джерел питного водопостачання пропонується використовувати мікроядерний тест у процесі встановлення екологічних стандартів якості – норм якості води, дотримання яких дасть змогу захищати водну екосистему та здоров'я людини від шкідливого впливу небезпечних речовин. *Ключові слова:* поверхневі води, водна екосистема, генотоксичність, мікроядерний тест, хімічні речовини.

**Research of the relevance of using the micronuclear test to protect the aquatic ecosystem from exposure to hazardous chemicals.**  
**Krainiukov O., Demenko A.**

The entry into the surface water bodies of hazardous chemicals is an urgent problem in the field of surface water quality management in different countries. Substances of genotoxic action are of particular danger. Purpose. To investigate the relevance of using micronucleus test as a tool for prevention of genotoxic impact of hazardous chemicals on aquatic ecosystems and human health. Methods. To achieve this purpose, the authors analyzed the latest scientific work on the above topics, which are presented in periodicals on platforms such as PubMed, Scopus, Google Scholar, Wiley and others. Results. Based on the latest world scientific achievements, a study was conducted on the relevance of using the micronucleus test as a tool to prevent genotoxic effects of hazardous chemicals on aquatic ecosystems and human health. Despite the fact that this method is not new, the interest of the scientific community in it does not fade. This is evidenced by the positive dynamics of the use of micronucleus test in studies published on the PubMed platform. The micronucleus test is used both in the detection of genotoxic properties of individual chemicals or mixtures, as well as in biomonitoring studies of surface waters. The authors focus on foreign and native works in which scientists used fish to detect genotoxic properties of various chemicals in water using a micronucleus test. This choice is due to the presence of a similar test reaction in fish and mammals, in particular humans, to the effects of hazardous chemicals. Conclusions. To increase the level of protection of surface water Ukraine and sources of drinking water, it is proposed to use micronucleus test in setting environmental quality standards – standards of water quality, compliance with which will protect aquatic ecosystems and human health from the harmful effects of hazardous substances. *Key words:* surface water, aquatic ecosystem, genotoxicity, micronucleus test, chemicals.

**Постановка проблеми.** Норми якості води поверхневих вод, які встановлені відповідно до положень Водної Рамкової Директиви 2000/60/ЄС (ВРД) [1], застосовуються до всіх поверхневих водних об'єктів, включаючи водні об'єкти, які є джерелами питного водопостачання. У процесі подачі питної води до споживача мають вже виконуватись жорсткіші вимоги до якості води,

які встановлені Директивою Про Питну Воду 98/83/ЄС [2].

Зв'язок між цими Директивами представлений у статті 7 ВРД. В ній зазначається необхідність забезпечення державами необхідного рівня захисту поверхневих водних об'єктів. Дотримання цієї статті дає змогу зменшити витрати на підготовку води відповідної якості для задоволення питних потреб населення.

Надходження до поверхневих вод небезпечних хімічних речовин є актуальною проблемою для України. Вона опосередкована необхідністю в забезпеченні захисту водної екосистеми та здоров'я людини від речовин, які можуть призводити від токсикологічних наслідків до порушень генетичної інформації в клітинах організму, мутагенних та канцерогенних наслідків.

Серед безлічі методів із визначення аномалій у розвитку таких важливих компонентів ядра клітини як хромосом та генів, які відповідають за збереження генетичної інформації, використовуються переважно такі цитогенетичні методи: визначення зміни частоти хромосомних аберацій, частоти мікроядер, порушення ДНК методом Comet тесту та Fish тестом [3]. Мікроядерний тест є порівняно простим, надійним і чутливим методом, для застосування якого необхідна мінімальна кількість обладнання [3]. Мікроядра, більш відомі як тільця Жоллі, були відкриті більше 50 років тому і як біомаркери генетичних порушень у клітинах були описані в подальших дослідженнях [4].

Мета роботи – здійснити дослідження актуальності використання мікроядерного тесту як інструменту для запобігання генотоксичного впливу небезпечних хімічних речовин на водні екосистеми та здоров'я людини.

Об'єктом дослідження є мікроядерний тест та його застосування науковцями в сучасній світовій практиці для захисту водної екосистеми.

Для досягнення поставленої мети було проаналізовано останні наукові роботи за визначеною вище тематикою, які представлені в періодичних виданнях на таких платформах, як PubMed, Scopus, Google Scholar, Wiley тощо.

**Виклад основного матеріалу.** Мікроядра утворюються з хромосомного матеріалу наступним чином. У процесі мітозу цей матеріал потрапляє лише в одну з дочірніх клітин. Там він може лока-

лізуватись в основне ядро або ж сформувати одне або кілька так званих «мікроядер» [5]. Причина ж їх утворення пояснюється наступними порушеннями клітинного механізму. Так, мікроядра, які несуть хромосомні фрагменти, виникають після прямих розривів ДНК, реплікації на ушкодженій ДНК-основі, репресії синтезу ДНК. Своєю чергою мікроядра, які включають цілі хромосоми, утворюються внаслідок порушень веретена розподілу, кинетохора або інших частин мітотичного апарата [3]. Цей феномен можна спостерігати в різних клітинах, однак легше за все проводити випробування з еритроцитами, оскільки ці клітини позбавлені основного ядра [5].

Основним показником тесту є частота виникнення клітин із мікроядрами. Іншим показником є частота виникнення клітин із подвійними ядрами [3]. Вибираючи досліджувані концентрації хімічної речовини, що нормується, необхідно дотримуватись певних вимог. Насамперед необхідно брати в серію досліджуваних концентрацій ту концентрацію речовини, яка є максимально неефективною, та концентрацію, при якій спостерігається максимальний ефект. Кількість аналізованих препаратів визначається постановкою експериментів. Однак мінімальна кількість досліджуваних еритроцитів на досліджувану вибірку, яка відповідає впливу хімічної речовини в одній визначеній концентрації з серії на тест-організм, не має бути меншою 4000 клітин [5].

Незважаючи на те, що цей метод не є новим, зацікавленість наукового співтовариства до його як інструменту з визначення генотоксичних аномалій в організмів не згасає. Про це свідчить наявність низки не тільки оглядових досліджень, а й прикладних [6–8].

Загальна динаміка використання цього методу протягом багатьох років авторами робіт, які були опубліковані на одній із найбільш відомих інформаційних наукових платформ PubMed, представлена на рис. 1.

Численні дослідження включають мікроядерний тест для виявлення пошкоджень ДНК і генотоксичних

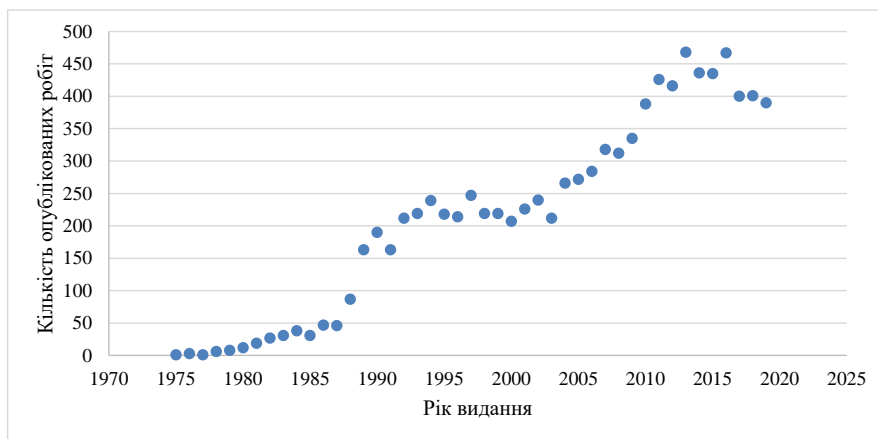


Рис. 1. Динаміка використання мікроядерного тесту в роботах, опублікованих на платформі PubMed

властивостей хімічних і радіоактивних речовин. У роботі [9] зазначається, що результати, які отримуються за допомогою такого методу, є подібними до результатів, які отримуються під час проведення аналізу фосфорилювання гістонового білку H2AX і Comet тесту, які більш трудомісткі і фінансово витратні.

Мікроядерний аналіз використовується як у процесі виявлення генотоксичних властивостей окремих хімічних речовин чи сумішей, так і в біомоніторингових дослідженнях поверхневих вод [10; 11].

Поширення набуло використання риб для виявлення генотоксичних властивостей хімічних речовин у воді за допомогою мікроядерного тесту. Оскільки ці тест-організми зазвичай реагують на небезпечні речовини подібно до ссавців, зокрема подібно до людини. Цим пояснюється використання риб як модельних тест-організмів під час проведення випробувань із визначення потенційно небезпечних для людини генотоксичних речовин [3].

У роботі [12] досліджено вплив рівня забрудненості поверхневих вод на риб *Wallago attu* і *Cirrhinus mrigala* за допомогою мікроядерного тесту та проведених гістопатологічних досліджень. Авторами було визначено наявність мікроядерних аномалій у клітинах риб, відібраних із більш забруднених ділянок річок.

У роботі [13] мікроядерний тест проводився на клітинах ракоподібних *Acanthocyclops robustus* і *Diaphanosoma mongolianum*, середовищем існування яких є забруднені органічними і неорганічними речовинами антропогенного походження водосховища Туніса. Авторами було визначено високу частоту клітин із мікроядрами протягом літа.

У роботі [14] авторами визначено високу частоту мікроядер у клітинах риб *Bathygobius soporator*, які були виловлені в місцях скиду міських і промислових стічних вод Бразилії. Подібний вплив забрудненої водної екосистеми річок у Косово було виявлено під час дослідження клітин риб *Rutilus rutilus* [15].

Про актуальність використання мікроядерного тесту в біомоніторингових дослідженнях зазначається і у вітчизняних роботах. Такий висновок було зроблено на основі дослідження репрезентативних створів нижньої течії р. Горинь на периферичній крові різних видів риб: верховодка (*Alburnus alburnus*), плітка (*Rutilus rutilus*), краснопірка (*Scardinius erythrophthalmus*), окунь річковий (*Perca fluviatilis*), карась сріблястий (*Carassius auratus gibelio*), лящ (*Abramis brama*) [16].

У роботі [8] авторами на основі аналізу наукової літератури робиться висновок про універсальність у використанні мікроядерного тесту на еритроцитах риб при визначенні впливу біотичних і абіотичних факторів для оцінки уразливості гідроєкосистем (так званого «здоров'я гідроєкосистем»).

Генетичний моніторинг цінних риб України за допомогою мікроядерного тесту пропонують проводити автори робіт [17; 18].

Як вже зазначалось вище, мікроядерний аналіз широко використовується для скринінгу нових хімічних речовин чи сумішевих препаратів на предмет їх генотоксичності, про що зазначається в роботах нижче.

Так, у статті [19] представлено вплив наночастинок цинку на клітини риб *Oreochromis niloticus*. За результатами дослідження авторами було виявлено наявність ядерних аномалій в еритроцитах при впливі наночастинок цинку протягом 7, 14 та 28 днів.

Вплив наночастинок циперметрину (CupNPs) та циперметрину (Cup) за допомогою мікроядерного тесту досліджено на *Channa punctatus*. Авторами визначено підвищену кількість мікроядерних аномалій у випробуваннях із циперметрином (Cup) [20].

Цитогенетичну дію фулерена C<sub>60</sub> на прісноводних риб *Anabas testudineus* досліджено у роботі [21]. Ця речовина широко використовується в медицині, косметології, промисловості тощо. Серйозні ядерні аномалії за допомогою мікроядерного тесту були зафіксовані в еритроцитах, зябрах та клітинах печінки при впливі наноматеріалів у концентраціях 5 мг/дм<sup>3</sup> та 10 мг/дм<sup>3</sup>.

Особливу небезпеку для водної екосистеми становлять пестициди, які широко використовуються в сільському господарстві і потрапляють до неї з фермерських угідь. Дослідження генотоксичного впливу цих речовин представлено нижче.

Небезпечний вплив комерційного продукту на основі тебуконазолу на предмет генотоксичності було досліджено авторами у роботі [22]. Випробувану речовину тестували на рибках *Danio rerio* в концентраціях 0, 100, 200 і 300 мкг/дм<sup>3</sup>. На основі проведеного дослідження у дорослих особин зазначених тест-організмів спостерігали не тільки порушення неврологічної функції у вигляді аномальної поведінки, а й генотоксичний ефект як наслідок дії речовини.

Генотоксичну дію фосфорорганічного пестициду хлорпірифосу за допомогою мікроядерного тесту визначено на рибках *Cyprinus carpio*, *Labeo rohita*, *Cnesterodon decemmaculatus* [23–25]. Ця речовина належить до Переліку пріоритетних забруднюючих речовин, які підлягають обов'язковому моніторингу у водному середовищі відповідно до Директиви 2013/39/ЄС [26]. У дослідженні [23] зазначається про наявність шкідливого впливу на організми навіть у порогових значеннях досліджуваних концентрацій.

Небезпечність імідаклопіда для генетичного матеріалу *Misgurnus anguillicaudatus* та *Prochilodus lineatus*, яка визначена за допомогою мікроядерного тесту, представлена у роботах [27; 28]. Аномальна поведінка при впливі цієї речовини спостерігалась під час проведення досліджень на *Danio rerio* та *Gobiocypris rarus* [29, 30].

Нині мікроядерний тест входить до набору тестів із проведення випробувань фармацевтичних препаратів для використання їх людиною, про що зазна-

чається в керівництві про тестування генотоксичності та інтерпретацію даних для фармацевтичних препаратів, призначених для використання людиною (ICH guideline S2 (R1)) [31], яке впроваджено в дію Європейським агентством із лікарських засобів (англ. European Medicines Agency, EMA). Метою цього документа її є прогнозування потенційних ризиків шляхом використання стандартного генотоксикологічного набору тестів, які прийняті і узгоджені на міжнародному рівні. Також мікроядерний тест входить до набору тестів для ідентифікації властивостей хімічної речовини відповідно до Регламенту Про реєстрацію, оцінку, авторизацію і обмеження хімічних речовин та препаратів (REACH, Annex VIII) № 1907/2006 від 18.12.2006 Європейського агентства хімічних речовин (англ. The European Chemicals Agency, ECHA) [32].

**Головні висновки.** Мікроядерний тест використовується як при виявленні генотоксичних

властивостей окремих хімічних речовин чи сумішей, а також у біомоніторингових дослідженнях поверхневих вод. Основну увагу авторами приділено зарубіжним і вітчизняним роботам, в яких науковці використовували риб для виявлення генотоксичних властивостей різних хімічних речовин у воді за допомогою мікроядерного тесту. Цей вибір пояснюється наявністю подібної тест-реакції у риб і ссавців, зокрема людини, на вплив небезпечних хімічних речовин.

На основі проведеного дослідження для підвищення рівня захисту поверхневих водних об'єктів України та джерел питного водопостачання, пропонується використовувати мікроядерний тест при встановленні екологічних стандартів якості – норм якості води, дотримання яких дозволить захищати водну екосистему та здоров'я людини від шкідливого впливу небезпечних речовин.

### Література

1. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of establishing a framework for Community action in the field of water policy (2000). URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj>
2. Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/1998/83/2015-10-27>
3. Архипчук В.В. Исследования в области цитологии рыб и биотестирования. *Сборник науч. трудов / Под ред. Малиновской М.В.* Киев : «Реликвии», 2008. 536 с.
4. Evans H.J., Neary G.J. & Williamson F.S. The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on Vicia Faba Roots and the Effect of Oxygen, *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1959. 1:3. P. 216–229. DOI: 10.1080/09553005914550311
5. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. Всемирная организация здравоохранения Женева, 1989. 211 с. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/144096/5225018343.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Ren N, Atyah M, Chen WY, Zhou CH. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. *J. Transl Med.* 2017. 15(1):110. DOI: 10.1186/s12967-017-1218-4
7. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(4):1534. DOI: 10.3390/ijms21041534
8. Klimenko N.A., Pylypenko Y.V., and Biedunkova O.O. Health assessment of hydro-ecosystems based on homeostasis indicators of fish: review of approaches. *Biosystems Diversity*, vol. 24. no. 1. 2016. P. 61–71. DOI: 10.15421/011607
9. Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet.* 2013. 4:131. DOI: 10.3389/fgene.2013.00131
10. Al-Sabti K, Metcalfe C D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995. 343(2-3). 121-35. DOI: 10.1016/0165-1218(95)90078-0
11. Farag M R., Alagawany M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chem Biol Interact.* 2018. 5; 279:73–83. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.11.007
12. Hussain B., Fatima M., Al-Ghanim K.A., Al-Misned F., Mahboob S. Assessment of DNA integrity through MN bioassay of erythrocytes and histopathological changes in *Wallago attu* and *Cirrhinus mirigala* in response to freshwater pollution. *Saudi J Biol Sci.* 2020. 27(1):251–260. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.09.003
13. Barka, S., Gdara, I., Ouanes-Ben Othmen, Z. *et al.* Seasonal ecotoxicological monitoring of freshwater zooplankton in Bir Mcherga dam (Tunisia). *Environ Sci Pollut Res.* 2020. 27. 5670–5680. DOI: 10.1007/s11356-019-04271-6
14. Galindo TP, Moreira LM. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet Mol Biol.* 2009. 32(2). 394–398. DOI:10.1590/S1415-47572009000200029
15. Asllani F.H., Schürz M., Bresgen N., Eckl P.M., Alija A.J. Genotoxicity risk assessment in fish (*Rutilus rutilus*) from two contaminated rivers in the Kosovo. *The Science of the Total Environment.* 2019. 676. 429–435. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.321.
16. Бедункова О.О. Генотоксичний моніторинг водного середовища у нижній течії річки Горинь. *Агроекологічний журнал.* 2017. № 1. С. 36–42. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/agrog\\_2017\\_1\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/agrog_2017_1_7).
17. Тарасюк С.І., Нагорнюк Т.А., Маріуца А.Е., Бочков В.М., Глушко Ю.М., Борисенко Н.О., Мендришора П.Д. Генетична оцінка окремих популяцій цінних видів риб України. Інститут рибного господарства НААН, Київ. 2016. URL: <https://er.nau.edu.ua/handle/NAU/34757>
18. Грициняк І.І., Тарасюк С.І., Залоїло О.В., Маріуца А.Е., Глушко Ю.М., Габуда О.А. Генетична структура сазана амурського ТзОВ Карпатський водограй. *Вісник аграрної науки.* 2018. № 7. С. 37–45. DOI: 10.31073/agrovisnyk201807-06

19. Abdel-Khalek, A.A., Morsy, K. & Shati, A. Comparative Assessment of Genotoxic Impacts Induced by Zinc Bulk- and Nano-Particles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2020. 104. 366–372. DOI: 10.1007/s00128-020-02799-9
20. Amjad S., Sharma A.K., Serajuddin M. Toxicity assessment of cypermethrin nanoparticles in *Channa punctatus*: Behavioural response, micronuclei induction and enzyme alteration. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018. 100. 127–133. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.10.004.
21. Sumi N, Chitra KC. Cytogenotoxic effects of fullerene C<sub>60</sub> in the freshwater teleostean fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Mutat Res*. 2019. 847. 503104. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.503104.
22. Castro, Tássia Flávia Dias, et al. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2018. 62. 140–146. DOI: 10.1016/j.etap.2018.06.011.
23. Mitkovska, V., & Chassovnikarova, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020. 27(7). 7166–7176. DOI: 10.1007/s11356-019-07408-9
24. Ismail, M., Ali, R., Shahid, M., Khan, M. A., Zubair, M., Ali, T., & Mahmood Khan, Q. Genotoxic and hematological effects of chlorpyrifos exposure on freshwater fish *Labeo rohita*. *Drug and chemical toxicology*. 2018. 41(1). 22–26. DOI: 10.1080/01480545.2017.1280047
25. Vera-Candioti, J., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environmental toxicology*. 2014. 29(12). 1390–1398. DOI: 10.1002/tox.21869
26. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>
27. Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., & Chang, Z. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental toxicology and pharmacology*. 2016. 45. 132–139. DOI: 10.1016/j.etap.2016.05.030
28. Alvim, T. T., & dos Reis Martinez, C. B. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019. 842. 85–93. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.011
29. Hong, X., & Zha, J. Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. *Science of the total environment*. 2019. 686. 311–321. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.028
30. Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., & Liber, K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment international*. 2015. 74. 291–303. DOI: 10.1016/j.envint.2014.10.024
31. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use>.
32. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. URL: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1907/2014-04-10>.