

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АЛКИЛИРУЮЩИХ АГЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ФИТОХИМИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Минина В.И.<sup>1,2</sup>, Буслаев В.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» СО РАН, Кемерово, e-mail: vminina@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», Министерство науки и высшего образования РФ, Кемерово, e-mail: vladislabus2358@yandex.ru

Химиотерапевтические препараты активно применяются в процессе лечения онкологических заболеваний ввиду проявления их деструктивных свойств на клетки опухоли. Однако действие данных веществ также связано с увеличением мутационного груза в нетрансформированных клетках организма, что приводит к тяжелым побочным эффектам. Для анализа последствий действия таких агентов часто применяется микроядерный тест, позволяющий одновременно учитывать кластогенные, анеугенные и пролиферативные изменения в любых клетках организма. В настоящее время большое внимание уделяется разработке способов снижения генотоксической нагрузки алкилирующих противоопухолевых препаратов на нетаргетные клетки, например с помощью фитохимических веществ. После реализации стратегии поиска научных статей с использованием критериев включения и исключения были изучены 33 публикации. Данный систематический обзор обобщает результаты современных исследований генотоксического потенциала противоопухолевых алкилирующих агентов (таких как цисплатин, метилметансульфонат и циклофосфамид) и эффектов совместного с ними действия фитохимических веществ с помощью микроядерного теста на клетках лабораторных животных. Результаты анализа данных литературы свидетельствуют о перспективности применения фитохимических агентов с целью снижения генотоксической нагрузки на нетрансформированные клетки организма при проведении химиотерапии.

Ключевые слова: химиотерапевтические агенты, алкиляторы, микроядра, микроядерный тест, фитохимические агенты.

## THE MICRONUCLEUS TEST FOR THE EVALUATION OF THE MODIFICATION OF THE GENOTOXIC POTENTIAL OF ALKYLATING AGENTS UNDER THE ACTION OF PHYTOCHEMICAL SUBSTANCES

Minina V.I.<sup>1,2</sup>, Buslaev V.Yu.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS, Kemerovo, e-mail: vminina@mail.ru;

<sup>2</sup>Kemerovo State University, Kemerovo, e-mail: vladislabus2358@yandex.ru

Chemotherapeutic drugs are the most widely used agents in cancer treatment due to their destructive properties accordingly to malignancies. However, action of these substances can lead to the side effects. Micronucleus test is widely used for evaluation of destructive consequences of such agents, due to it's ability for clastogenic, proliferative and aneugenic effects detection in various cells of organism. Nowadays great attention is focused on development of some different ways for attenuation of alkylating antitumoral substances genotoxic potential on non-target cells, for example via phytochemical agents. After realization of scientific publications search strategy with the use of including and excluding criteria, 33 publications were included. This systematic review includes results of novel scientific publications that were focused on investigation of the genotoxic potential of antitumoral alkylating agents (cisplatin, methyl methansulphonate and cyclophosphamide) and effects of their simultaneous action with phytochemical agents using micronucleus test method on laboratory animals cells. Results of this analysis demonstrated perspective of phytochemical agents application for attenuation of genotoxicity accordingly to somatic cells that are affected by chemotherapy.

Keywords: chemotherapeutic agents, alkylating drugs, micronuclei, micronucleus test, phytochemical agents.

Рак называют одной из ведущих причин роста смертности во всем мире. Новые статистические данные 2018 г. указывают на увеличение числа случаев онкологических заболеваний до 18,1 миллиона и количества летальных исходов от рака до 9,6 миллиона [1].

В химиотерапии широко используются алкилирующие агенты, обладающие сильными цитотоксическими и деструктивными свойствами. Общим механизмом действия данных соединений является алкилирование азотистых оснований в положении N-7 гуанина в составе молекулы ДНК [2]. Была показана возможность алкилирующих агентов индуцировать специфические стрессовые реакции, способные приводить к активации некоторых компонентов репарации ДНК и элиминации клеток посредством апоптоза [3]. Действие алкилирующих агентов может индуцировать накопление мутаций не только в опухолевых, но и в нетрансформированных клетках организма, повышая риск возникновения вторичных опухолей.

В контексте исследования генотоксической активности микроядерный тест является одним из наиболее чувствительных и хорошо воспроизводимых методов. Микроядра могут быть обнаружены в делящихся клетках и представляют собой фрагменты хромосом (кластогенные эффекты) или целые хромосомы, отставшие на стадии анафазы в ходе митотического деления (анеугенные эффекты). Микроядерный тест (МЯ тест) позволяет также оценивать пролиферативные и цитотоксические эффекты действия различных агентов [4, 5]. Разработаны методики учета микроядер в клетках разных тканей, органов, организмов, в том числе полиорганный микроядерный тест [6].

МЯ тест активно используется для оценки мутагенного потенциала различных противоопухолевых препаратов. В настоящее время происходят активный поиск специфических модификаторов мутагенеза и разработка новых альтернативных комплексов противораковых препаратов. Особое внимание уделяется фитохимическим веществам – вторичным метаболитам, полученным из растительных организмов. Они характеризуются проявлением многих активностей, в частности антимуtagenной, антиоксидантной и антипролиферативной. МЯ тест в данном случае может выступать в качестве чувствительного цитогенетического метода для эффективной оценки снижения деструктивного действия химиотерапевтических агентов.

Цель исследования: обобщить опыт использования МЯ теста для оценки генотоксического потенциала противоопухолевых алкилирующих агентов и возможностей для его модификации с помощью препаратов растительного происхождения.

Для поиска статей были использованы электронные базы данных PubMed, Web of Science и TOXLINE.

*Критерии включения.* Для анализа были использованы статьи, полный текст которых был опубликован на английском языке за последние 10 лет, в которых оценка возможности ослабления повреждений генома алкиляторами (такими как цисплатин, метилметансульфонат и циклофосфамид) под действием фитохимических веществ

проводилась с применением стандартного МЯ теста на клетках лабораторных животных. *Критерии исключения.* Исключались данные работ, выполненных на клетках крови человека (поскольку таких обзоров опубликовано уже довольно много); результаты нерандомизированных исследований; статьи, которые описывали процесс формирования МЯ при действии других препаратов.

В результате реализации данной стратегии поиска были найдены экспериментальные работы, которые были посвящены исследованию генотоксического потенциала алкиляторов. Они были проведены при использовании различных клеток лабораторных животных с применением МЯ теста при комбинации с другими методиками. Исследование по оценке генотоксических эффектов циклофосфида было осуществлено на полихроматических и нормохроматических эритроцитах лабораторных животных [7]. МЯ тест при комбинировании с анализом *rig-a* мутации и  $CD^{59}$  мутантного фенотипа, выполненный на ретикулоцитах и эритроцитах грызунов, подтвердил повышение частоты aberrантных клеток при действии цисплатина [8]. В одном из экспериментов гепатоциты грызунов были использованы для демонстрации деструктивных свойств метилметансульфоната [9]. Кроме того, было также определено, что оценка генотоксического потенциала химиотерапевтических агентов может осуществляться при использовании таких цитогенетических и молекулярно-биологических методов, как FISH, иммуноокрашивание CREST и реакции RAPD-PCR со случайными праймерами [10-12]. Отмечено наличие достаточного количества работ по описанию протективных характеристик фитохимических веществ при их совместном действии с противоопухолевыми препаратами. Поскольку отсутствие математической однородности отобранных экспериментальных результатов не позволяло корректно выполнить мета-анализ, был выбран формат представления работы в виде систематического обзора.

Один из самых широко известных противоопухолевых алкилирующих препаратов – циклофосфамид (cyclophosphamide, CP). Основные эффекты действия данного вещества связаны с образованием фосфорамида в качестве основного вторичного метаболита. Фосфорамида способствует формированию межцепочечных и внутрицепочечных сшивок в составе ДНК и сшивок ДНК – белок [13]. В настоящее время активно тестируются протективные свойства различных растительных экстрактов. Были описаны эффекты масляного экстракта *Carapa guianensis* (крабовое дерево) биологически активных субстанций, изолированных из двурядки тонколистной (*Diplotaxis tenuifolia*), и спиртового экстракта *Spondias dulcis* [14-16]. МЯ тест на клетках костного мозга лабораторных мышей с использованием различных доз и комбинаций препаратов позволил продемонстрировать

статистически значимое снижение частоты клеток с микроядрами при использовании данных фитохимических субстанций (таблица).

Модификация генотоксических свойств алкиляторов с помощью фитохимических агентов

Фитохимический агент	Концентрация (фитохимический агент+алкилятор)	Средняя частота микроядер		P value	Автор
		Опыт	Контроль*		
Цисплатин (Csp)					
Биксин	0,05 мг/мл+Csp	40,00 ± 6,20	92,80 ± 12,40	p<0,05	dos Santos <i>et al.</i> , 2012
	0,08 мг/мл+Csp	28,30 ± 2,10			
	0,10 мг/мл+Csp	26,00 ± 1,00			
Галловая кислота	100 мг/кг+Csp	1,50 ± 0,04	3,70 ± 0,11	p<0,001	Shruthi and Shenoy., 2018
	200 мг/кг+Csp	1,84 ± 0,03			
	400 мг/кг+Csp	2,50 ± 0,06			
Метморфин	50 мг/кг+ Csp	44,20 ± 2,63	73,40 ± 3,23	p<0,001	Cheki <i>et al.</i> , 2019
	100 мг/кг+ Csp	26,80 ± 2,00			
Метилметансульфонат (MMS)					
Артепилин С	2,5 μM + MMS	10,33 ± 4,16	25,67 ± 3,79	p<0,05	de Oliveira <i>et al.</i> , 2013
	5 μM + MMS	12,67 ± 1,53			
	10 μM+ MMS	12,00 ± 2,00			
Экстракт Solanum lycocarpum	16мг/мл+ MMS	9,60 ± 4,90	28,0 ± 1,7	p<0,001	Andrade <i>et al.</i> , 2016
	32 мг/мл+ MMS	11,70 ± 1,50			
	64 мг/мл+ MMS	10,30 ± 1,50			
Циклофосфамид (CP)					
Экстракт Carapa guianensis	250 мг/кг + CP	15,40 ± 1,49	18,4 ± 1,02	p<0,05	Lemes <i>et al.</i> , 2017
	500 мг/кг + CP	13,80 ± 1,93			
	1000 мг/кг + CP	13,60 ± 2,15			
Экстракт Spondias dulcis	500 мг/кг+CP	7,80 ± 1,63	34,75 ± 4,97	p <0,05	Araujo <i>et al.</i> , 2019
	1000 мг/кг +CP	8,17 ± 2,40			
	1500 мг/кг +CP	10,33 ± 2,39			
* контроль (действует только алкилятор)					

Цисплатин (Csp) является первым противораковым препаратом, разработанным на основе атома платины [17]. При взаимодействии с молекулой ДНК данное вещество участвует в возникновении ДНК-аддуктов, внутрицепочечных и межцепочечных сшивок ДНК, проявляя таким способом активность, схожую с действием алкилирующих агентов [18-20]. Результаты экспериментов с фитохимическими агентами подтверждают возможность корректировки генотоксических свойств Csp. Так, сравнительно недавно была

продемонстрирована возможность коррекции высокого уровня микроядер, индуцированных действием Csp на клетки костного мозга лабораторных мышей, при помощи галловой кислоты и метморфина – гипогликемического препарата, получаемого из сирени обыкновенной [21, 22]. Было описано снижение частоты клеток с микроядрами при совместном действии Csp и биксина (каротиноидный пигмент растений *Vixia Orellana*) на клетках линии PC12 [23]. Дозы препаратов и уровень микроядер, выявленные в этих работах, представлены в таблице.

Метилметансульфонат (MMS) относится к группе алкилирующих агентов, широко используемых в противораковой терапии. Данное соединение способствует метилированию азотистых оснований ДНК преимущественно в положениях N-7-деоксигуанина и N3-деоксиаденина. К наиболее распространенным повреждениям молекулы ДНК, индуцированным под действием данного агента, относятся двойные разрывы. В качестве перспективных протективных агентов для MMS в настоящее время рассматривают: фенольный компонент бразильского зеленого прополиса артепилин С и водно-спиртовой экстракт *Solanum lycocarpum* [24, 25]. Для артепилина С характерно проявление множественной функциональной активности, которая включает противоопухолевые, апоптоз-стимулирующие и антиоксидантные свойства. Экстракт *Solanum lycocarpum* применяется в лечении диабета и ожирения ввиду его способности к уменьшению уровня холестерина. Антигенотоксический потенциал *Solanum lycocarpum* и артепилина С изучался с использованием культуры легочных фибробластов китайского хомячка (V79). Было показано двукратное снижение частоты клеток с микроядрами при совместном действии с MMS даже в минимальных дозах фитохимических агентов (табл.) [24, 25].

Разработка и дизайн противораковых препаратов представляют собой перспективное направление для повышения качества терапии онкологических заболеваний. В настоящее время химиотерапевтические агенты, обладающие широким спектром своего действия, активно используются в подобных процедурах. Отмечается высокая значимость поиска подобных препаратов в составе природных компонентов окружающей среды, в особенности растительных организмов [26]. Химиотерапевтические агенты, которые традиционно используются в терапии рака, могут быть разделены на 4 группы: алкилирующие агенты, антиметаболиты, цитостатические агенты и ингибиторы топоизомераз.

Исследование молекулярных механизмов действия химиотерапевтических агентов позволяет установить базовые основы формирования цитогенетических аномалий под действием данных веществ. Определенный систематический обзор, исследовавший генотоксические эффекты химиотерапевтических агентов, содержит в своем составе описание всех возможных мутаций в ДНК, индуцированных под действием противораковых

препаратов [27]. В данном обзоре также была отмечена роль адаптации реакций клеточного цикла во время действия данных веществ. Разнообразие генотоксических свойств химиотерапевтических препаратов объясняется сложностью строения их химической структуры, развитие мутаций в молекуле ДНК происходит согласно определенным химическим механизмам. Большое количество мутаций, индуцированных под действием химиотерапевтических агентов, создает основу для развития кластогенных или анеугенных эффектов.

Для изучения генотоксического потенциала химиотерапевтических агентов важным этапом является выбор достоверного диагностического критерия. Классический МЯ тест представляет собой общепринятый способ оценки деструктивного влияния многих факторов окружающей среды, в том числе ксенобиотиков [28]. Данный метод был также определен в качестве адекватного диагностического критерия при оценке токсического и канцерогенного эффекта действия лекарственных противоопухолевых препаратов [29].

В настоящее время возрастает уровень публикаций, посвященных проблеме модификации генотоксических эффектов различных химиотерапевтических агентов под действием других веществ. В данном случае рассматривается возможность ослабления деструктивных свойств противораковых препаратов ввиду их сильного мутагенного потенциала. В качестве кандидатных препаратов в этом случае могут выступать фитохимические вещества, полученные из растительных организмов [30]. Данные растения относятся к группе лекарственных, широко применяемых в терапии определенных патологических заболеваний. Биологически активные вещества, которые экстрагируются из этих растений, могут быть классифицированы по химическому и фармакологическому принципу. К ним относятся каротиноиды, фенольные соединения, алкалоиды, азотсодержащие и сульфосодержащие соединения.

Более подробное рассмотрение механизмов проявления антигенотоксических свойств фитохимических веществ имеет большое значение для исследований. Наиболее распространенной является антиоксидантная активность, которая характерна для каротиноидных соединений, а также фенольных компонентов растений, способных ингибировать формирование активных форм кислорода, образующихся в результате взаимодействий алкиляторов с молекулой ДНК. Кроме того, некоторые исследования указывают на возможность иммуномодуляторных эффектов действия фитохимических агентов [31]. В этом случае главным образом проявляются противовоспалительные эффекты, которые выражаются в предотвращении синтеза цитокинов и гистамина, что предопределяет целесообразность применения галловой кислоты в терапии аллергических реакций.

Ключевым моментом в проявлении хемопротективных свойств фитохимическими агентами является защита системы гемопоэза от действия алкиляторов. В частности, такие вещества, как метмофрин, характеризуются способностью к стимуляции гемопоэза [32]. Под его действием также проявляются антирадиационные защитные свойства: происходит предотвращение уменьшения числа клеток крови под действием ионизирующего излучения [33]. На примере моделей лабораторных мышей было продемонстрировано восстановление численности клеток периферической крови и усиление гемопоэза при развитии анемии Фанкони.

**Заключение.** МЯ тест позволяет обеспечить быструю и информативную диагностику кластогенных, анеугенных и цитотоксических эффектов и, судя по результатам современных экспериментальных работ, может быть полезен при оценке эффективности применения фитохимических субстанций для снижения генотоксической нагрузки и поддержки организма в период химиотерапии алкилирующими агентами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Исследование было поддержано государственным заданием на 2019–2021 гг. № 0352-2019-0011 и грантом РФФИ 20-44-420012 p\_a.*

### Список литературы

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2018. vol. 68. no. 6. P.394–424.
2. Polavarapu A., Stillabower J.A., Stubblefield S.G.W., Taylor W.M., Baik M-H. The Mechanism of Guanine Alkylation by Nitrogen Mustards: A Computational Study. The journal of organic chemistry. 2012. vol.77. no.14. P.5914–5921.
3. Ah-Koon L., Lesage D., Lemadre E., Souissi I., Fagard R., Varin-Blank N. Cellular response to alkylating agent MNNG is impaired in STAT1-deficient cells. Journal of cellular and molecular medicine. 2016. vol. 20. no.10. P.1956–1965.
4. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutation research. 2003. vol. 534. no(1-2). P.65-75.
5. Fenech M., Knasmueller S., Bolognesi C., Bonassi S., Holland N., Migliore L. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to

micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation research*. 2016. vol.770. P.12–25.

6. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / Под ред. Ю.А. Рахманина, Л.П. Сычёвой. М.: Гениус, 2007. 312 с.

7. Arencibia-Arrebola D.F., Rosario-Fernandez L.A., Suarez-Fernandez Y.E., Vidal-Novoa A. Comparison of micronuclei frequency in bone marrow cells of three rat lines. *Cytology and Genetics*. 2013. no. 2. P.118–123.

8. Dertinger S.D., Avlasevich S.L., Torous D.K., Bemis J.C., Phonethepawth S., Labash C. Persistence of Cisplatin-Induced Mutagenicity in Hematopoietic Stem Cells: Implications for Secondary Cancer Risk Following Chemotherapy. *Toxicological Sciences*. 2014. vol.140. no.2. P.307–314.

9. Muto S., Yamada K., Kato T., Wako Y., Kawasako K., Iwase Y., et al. Assessment of methyl methanesulfonate using the repeated-dose liver micronucleus assay in young adult rats. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2015 vol.780–781.P.107–110.

10. Attia S.M. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of genotoxic potential of amsacrine and nocodazole in mouse bone marrow cells: Clastogenicity and aneugenicity of amsacrine and nocodazole. *Journal of applied toxicology*. 2013. vol. 33. no.6. P.426–433.

11. Basso E., Fiore M., Leone S., Degrassi F., Cozzi R. Effects of resveratrol on topoisomerase II-activity: induction of micronuclei and inhibition of chromosome segregation in CHO-K1 cells. *Mutagenesis*. 2013. vol.28. no.3. P.243–248.

12. El-Alfy N.Z., Alqosaibi A.I., Mahmoud M.F., El-Ashry S.R. An analysis of micronuclei and DNA damage induced by metotrexate treatment of male albino mice. *The Egyptian journal of hospital medicine*. 2016. vol. 65. no.1. P.504–514.

13. Groehler A., Villalta P.W., Campbell C., Tretyakova N. Covalent DNA–Protein Cross-Linking by Phosphoramidate Mustard and Nornitrogen Mustard in Human Cells. *Chemical Research in Toxicology*. 2016. vol. 29. no. 2. P.190–202.

14. Lemes S.R., Chaves D.A., Silva Júnior N.J.D., Carneiro C.C., Chen-Chen L., Almeida L.M.D., et al. Antigenotoxicity protection of *Carapa guianensis* oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. *Anais de Academia Brasileira Ciências*. 2017. vol.89. no.3. P. 2043–2051.

15. López Nigro M.M., Peroni R.N., Ayllón-Cabrera I., Schiariti Lampropulos V.E., Roma M.I., Carballo M.A. In vivo antigenotoxic activity of *Diplotaxis tenuifolia* against cyclophosphamide-induced DNA damage: Relevance of modulation of hepatic ABC efflux transporters. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2018. vol.836.P.72–78.

16. Araujo C de S., Brito L.D., Tarifa M.O., Silva N.J.F., Rodrigues K.S., Cavalcante D.G.S.M., et al. Protective effects of bark ethanolic extract from *Spondias dulcis* Forst F. against DNA damage induced by Benzo[a]pyrene and Cyclophosphamide. *Genetical and Molecular Biology*. 2019.P.1-25.
17. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*. 2007. vol 7. no.8. P.573–584.
18. Hoebbers F.J., Pluim D., Hart A.A., Verheij M., Balm A.J., Fons G. Cisplatin-DNA adduct formation in patients treated with cisplatin-based chemoradiation: lack of correlation between normal tissues and primary tumor. *Cancer Chemother Pharmacology*. 2008. vol.61. no. 6.P.1075–1081.
19. Shu X., Xiong X., Song J., He C., Yi C. Base-Resolution Analysis of Cisplatin-DNA Adducts at the Genome Scale. *Angewandte chemie*. 2016. vol.55. no.46. P.14246–14249.
20. Enoiu M., Jiricny J., Schärer O.D. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Research*. 2012. vol.40. no 18. P.8953–8964.
21. Shruthi S., Bhasker Shenoy K. Genoprotective effects of gallic acid against cisplatin induced genotoxicity in bone marrow cells of mice. *Toxicology Research*. 2018.vol.7.no.5.P.951–958.
22. Cheki M., Ghasemi M.S., Rezaei Rashnoudi A., Erfani Majd N. Metformin attenuates cisplatin-induced genotoxicity and apoptosis in rat bone marrow cells. *Drug and Chemical Toxicology*. 2019 vol. 9.P.1–8.
23. dos Santos G.C., Mendonça L.M., Antonucci G.A., dos Santos A.C., Antunes L.M.G., Bianchi M. de L.P. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2012.vol.50. no 2.P.335–40.
24. de Oliveira P.F., Lima I.M., Monteiro Neto Mde A., Bastos J.K., da Silva Filho A.A., Tavares D.C. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artemisinin in V79 cells by the comet and micronucleus assays. *Nutrition and Cancer*. 2013.vol.65. no.7.P.207–228.
25. Andrade A.F., Alves J.M., Corrêa M.B., Cunha W.R., Veneziani R.C.S., Tavares D.C. In vitro cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of *Solanum lycocarpum* hydroalcoholic extract. *Pharmaceutical Biology*. 2016. vol.54. no.11.P.2786–2790.
26. Poonam S., Chandana M. A review on anticancer natural drugs. *International journal of pharmtech research*. 2015. vol.8. no.7. P.131-144.
27. Swift L., Golsteyn R. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *International journal of molecular sciences*. 2014. vol.15.no.3.P.3403–3431.

28. Sram R.J., Svecova V., Rossnerova A. Systematic review of the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay to measure DNA damage induced by exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation research*. 2016. vol. 770. P.162–169.
29. Villarini M., Gianfredi V., Levorato S., Vannini S., Salvatori T., Moretti M. Occupational exposure to cytostatic/antineoplastic drugs and cytogenetic damage measured using the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Mutation research*. 2016.vol. 770.P.35–45.
30. Lopez-Romero D., Izquierdo-Vega J.A., Morales-González J.A., Madrigal-Bujaidar E., Chamorro-Cevallos G., Sánchez-Gutiérrez M.. et al. Evidence of some natural products with antigenotoxic features. *Plant 2: plants. vegetables and natural resin. Nutrients*. 2018.vol.10.no.12.P.1-46
31. Saraphanchotiwitthaya A., Sripalakit P. Anti-inflammatory effect of *Morinda citrifolia* leaf extract on macrophage RAW 264.7 cells. *Science Asia*. 2015.vol. 41.no.1.P.5.
32. Zhang Q-S., Tang W., Deater M., Phan N., Marcogliese A.N., Li H., et al. Metformin improves defective hematopoiesis and delays tumor formation in Fanconi anemia mice. *Blood*. 2016. vol. 128. no.24. P. 2774–2784.
33. Bikas A., Van Nostrand D., Jensen K., Desale S., Mete M., Patel A., et al. Metformin Attenuates <sup>131</sup>I-Induced Decrease in Peripheral Blood Cells in Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016. vol.26. no 2. P.280–286.