

АКТИВНІСТЬ НЕНУКЛЕОЗИДНИХ ІНГІБІТОРІВ РЕПАРАТИВНОГО ФЕРМЕНТУ O⁶-МЕТИЛГУАНІН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ В КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

К.С. ЖУВАКА¹, Г.П. ВОЛИНЕЦЬ², Т.П. РУБАН¹, З.М. НІДОЄВА¹, А.П. ЯЦИШИНА¹, Л.Л. МАЦЕВИЧ¹, В.Г. БДЖОЛА², С.М. ЯРМОЛЮК², Л.Л. ЛУКАШ¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, відділ Генетики людини, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

² Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, відділ Біомедичної хімії, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

E-mail: kateopryshko@gmail.com, g.p.volynets@gmail.com, tullip@ukr.net, zarinanidoeva@gmail.com, yazishinaa@yahoo.com, macewicz71@gmail.com, bdzhol@gmail.com, serhiy.yarmoluk@gmail.com, luKash.imbg@gmail.com

Одним зі способів підвищення ефективності алкілувальної хіміотерапії є зменшення рівня репаративного білка MGMT (O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза) в ракових клітинах. Стандартний інгібітор MGMT O⁶-бензилгуанін (БГ) виявився цитотоксичним для гемопоетичних клітин на третій стадії клінічних досліджень, тому пошук нових альтернативних інгібіторів є актуальним. В цій роботі були проведені дослідження для визначення цитотоксичності та ефективності нових потенційних інгібіторів MGMT, які були змодельовані за допомогою молекулярного гнучкого докину. На першому етапі дослідження для оцінки цитотоксичності були проведені MTT- та клоногенний тести, за яких клітини HEp-2 культивували з досліджуваними сполуками у концентрації 10 мкМ. На другому етапі проводили оцінку ефективності сполук. Одним з методів дослідження був клоногенний тест, за якого обробка клітин складалась з комбінацій досліджуваних сполук (10 мкМ) та алкілувального агенту N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (MNNG) в різних концентраціях. Ще одним методом був Вестерн-блот аналіз, для якого білки екстрагували з клітин HEp-2, оброблених потенційними інгібіторами у комбінації з MNNG. Отримані результати були проаналізовані в програмах Microsoft Excel 2016, Origin8.1 та ImageLab. В результаті 4 з 5 досліджуваних сполук продемонстрували низьку цитотоксичність в концентрації 10 мкМ в клітинах HEp-2, порівняно зі стандартним інгібітором БГ. За даними клоногенного тесту найбільш ефективною виявилась сполука 41В (5-Бензо[1,3]діок-сол-5-ілметилен-тіазолідин-2,4-діон), а також високу ефективність проявили сполуки 41 (5-(5-Хлоро-2-гідрокси-бензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он) та 89(2-[5-(4-Бromo-феніл)-піримідин-4-іл]-5-етокси-фенол). Результати Вестерн-блот аналізу показали значне зниження білка MGMT після обробки сполуками 41, 41В та 89, тим самим підтверджуючи інгібувальні властивості даних сполук.

Ключові слова: Репаративний фермент MGMT, нові потенційні інгібітори MGMT, алкілуючий агент, клітинна лінія HEp-2.

Вступ. Хіміотерапія широко використовується для лікування раку. Алкілувальні сполуки застосовують для лікування багатьох видів онкозахворювань вже понад 40 років. Найпоширенішими алкілуючими агентами є темозоломід, дакарбазин і ломустин. Також у медицині застосовують хлороетилюючі агенти, такі як нідраном і кармустин (Christmann et al, 2011; Pegg, 2011). Ці сполуки спричиняють численні первинні пошкодження клітинної ДНК, серед яких найбільш мутагенним є O⁶-метилгуанін. Індуцибельний фермент репарації O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) видаляє цей метильний залишок з гуаніну в різних типах клітин. Таким чином MGMT протидіє роботі алкілуючих агентів і призводить до хіміорезистентності пухлин (Kaina et al, 2010; Christmann et al, 2011, Pegg, 2011). Фермент MGMT здійснює незворотню реакцію, переносячи метильний адукт на себе, а потім піддається протеосомній деградації. Саме тому виснаження ферменту вимагає підтримання високої концентрації алкіл-/хлороетилових сполук в організмі пацієнта. Однак такий підхід призводить до тяжкої гематологічної токсичності, що робить алкілувальну хіміотерапію дуже шкідливою для пацієнтів (Verbeek et al, 2008; Sharma et al, 2009). Доцільніше вводити в схему хіміотерапії інгібітори MGMT замість того, щоб збільшувати дозу алкілуючих препаратів. Саме тому інгібітори MGMT, такі як O⁶-бензилгуанін та O⁶-(4-бромтієніл)гуанін, застосовуються в медицині (Verbeek et al, 2008; Kaina et al, 2010). Ці інгібітори мають високу

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

спорідненість до ферменту і функціонують як так звані псевдосубстрати MGMT (Pegg, 2000; Mitra, 2007). Темозоломід у поєднанні з інгібіторами продемонстрував величезний терапевтичний потенціал для лікування пацієнтів з онкологічними захворюваннями в ході I, II та III фаз клінічних досліджень (Oshiro et al, 2009). Цей підхід доводить ефективність комбінації алкілюючих препаратів з інгібіторами MGMT для лікування різних видів раку (гліоми, карциноми легень, меланоми, лімфоми та раку кишечника), що призводить до подовження тривалості життя пацієнтів (Quinn et al, 2009; Zhung et al, 2020).

На жаль, під час третього етапу клінічних досліджень було виявлено, що застосування інгібіторів обумовлює до підвищення цитотоксичності хіміотерапії, особливо для гематопоетичних клітин. Більше того, їх тривале застосування в поєднанні з алкілюючими сполуками призводить до мієлосупресії та вторинних пухлин (Ranson et al, 2006). Саме тому пошук нових низькотоксичних інгібіторів MGMT є актуальним завданням.

Методи і матеріали. *Культура клітин і умови культивування.* Дослідження проводили на лінії ракових клітин HEP-2. Культивування клітин здійснювали в середовищі DMEM (DMEM Powder (1×) High glucose (4,5 г/л) with L-glutamine, PPA) із додаванням 10%-вої інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS, «Biowest»), 200 ОД/мл бензилпеніциліну та 200 мкг/мл стрептоміцину (ПАО «Київмедпрепарат») при температурі 37 °С та у газовій фазі повітря із 5 % CO₂.

Молекулярний докінг. Молекулярний докінг колекції сполук OTAVA, що містить близько 100 000 лігандів (Otava Ltd. www.otavachemicals.com/), у активний центр MGMT людини (PDB ID: 1EH6) проводили за допомогою програми Autodock 4.2 (Morris et al, 2009). Молекули ліганду та води були видалені з кристалічної структури. Карти рецепторів готували за допомогою програми MGL Tools (Morris et al, 2009). Сполуки відфільтровували згідно з правилами Ліпінського (Lipinski, 2004). Хімічні структури сполук зберігали у форматі PDBQT за допомогою програми Vega ZZ 2.4 (Pedretti et al, 2021). Сполуки з найкращими показниками скорингової функції візуально аналізу-

вали в комплексах з активним центром MGMT за допомогою програми Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). Було синтезовано сполуки з найкращими потенційними інгібуючими властивостями. У наступних експериментах сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО).

МТТ-тест. Для оцінки цитотоксичності потенційних інгібіторів у 96-лункові мікропланшети вносили 5000 клітин HEP-2 у кожен лунку, після чого додавали інгібітори, розчинені в ДМСО у концентрації 10 мкМ. Після 48 год інкубації в лунки додавали реагент МТТ та інкубували впродовж 3–4 год. Формазан, утворений клітинами після обробки МТТ, вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) при довжині хвилі 570 нм.

Клоногенний тест. Клітини HEP-2 культивували в середовищі DMEM з 20%-вої бичачої сироватки і сіяли з розрахунком 1000 клітин на чашку Петрі (d = 10см). На другий день культивування додавали потенційні інгібітори та O⁶-бензилгуанін (позитивний контроль) у концентрації 10 мкМ. Негативний контроль був без обробки інгібіторами.

Щоб перевірити, чи здатні нові інгібітори MGMT виснажувати цей фермент у клітинах і сенсibilізувати їх до алкілювального препарату, на третій день середовище замінювали на безсироваткове та додавали N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (MNNG) у різних концентраціях (0,5, 0,05, 0,005 та 0,0005 мкг/мл) і культивували протягом однієї години. Потім замінювали на середовище з 20%-вої бичачої сироватки та інгібіторами (10 мкМ).

Клітини культивували за стандартних умов ще 8–12 днів. Колонії клітин HEP-2 забарвлювали метиленовим синім і підраховували (>75 клітин).

Вестерн-блот аналіз. Клітини HEP-2 культивували, як описано вище. Клітини інкубували з інгібіторами (10 мкМ) протягом 24 год з наступною обробкою 50 або 0,5 мкг/мл нітрозогуанідину впродовж 1 год. Після 2 діб культивування з клітин виділяли білки за стандартною методикою (Green et al, 2012), концентрацію білків вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) в режимі «Protein A280». Виділені біл-

ки розділяли за допомогою електрофорезу в ПААГ і переносили на полівінілдіфторидну мембрану («Millipore», США) методом мокрого переносу в системі Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad», Великобританія). Для Вестерн-блотингу використовували первинні антитіла до MGMT («NovusBiologicals», США, № NB100-168) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma-Aldrich», США, № A9044). Хемілюмінесценцію детектували за допомогою системи ChemiDoc Imaging System («Bio-Rad», США), час експозиції становив від 10 до 200 с, залежно від інтенсивності сигналу. Мембрану забарвлювали фарбою Coomassie blue R350 як контроль нанесення сумарного білка, а рівномірність нанесення білка перевіряли за допомогою денситометричної оцінки загальної кількості білка, що фіксувався на мембрані, в програмі Origin.8.1.

Статистичний аналіз. Дані, зібрані в цьому дослідженні, були проаналізовані за допомогою комп'ютерних програм, зокрема Microsoft Excel 2016 та Origin 8.1. Статистичний аналіз проводили з використанням різних показників, включаючи середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (SEM) та стандартні відхилення. Експерименти повторювали 2–4 рази, кожен експеримент складався з 2–6 ідентичних обробок. Вестерн-блот аналіз проводили двічі з 3 технічними повторами. Статистичну значущість міжгрупових відмінностей визначали за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA), кореляції вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати. Молекулярний докінг потенційних нуклеозидних інгібіторів MGMT. З метою пошуку нових нуклеозидних інгібіторів MGMT людини ми провели молекулярний докінг колекції сполук OTAVA з активним центром MGMT людини (PDB ID: 1T38). Як видно з рис. 1, а, O⁶-метилгуанін бере участь у гідрофобних взаємодіях з Tyr114, Ser145, Ser159, Met134, Arg135, Tyr158 та утворює водневі зв'язки з Ser145, Ser159, Tyr158 і Val148 в активному центрі MGMT. Молекулярний докінг показав, що O⁶-бензилгуанін зв'язується з MGMT подібно до O⁶-метилгуаніну, з додаванням гідрофобної взаємодії з Pro40 (рис. 1, б). За результатами молекулярного докінгу відібрано та синтезовано 89 потенційних нуну-

клеозидних псевдосубстратів для MGMT (сполуки 1–89) для дослідження їхньої інгібувальної активності.

Попередній біохімічний скринінг з використанням MGMT аналізу в неклітинній системі дозволив відібрати декілька перспективних сполук. Подальші експерименти з пухлинними клітинами людини *in vitro* показали, що такі сполуки, як 5-(5-Хлоро-2-гідрокси-бензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он (41), 5-Бензо[1,3]діоксол-5-ілметилен-тіазолідин-2,4-діон (41В), 3-Аміно-10Н-9-окса-2,4-діаза-фенантрен-10-ол (46), 2-(2,4-Дихлоро-феніл)-імідазо[1,2-а]піридин-8-іламін (72) і 2-[5-(4-Бromo-феніл)-піримідин-4-іл]-5-етокси-фенол (89), можуть розглядатися як найбільш перспективні потенційні інгібітори (Volynets et al, 2020) (таблиця).

Сполука 41, що була досліджена нами раніше (Volynets et al, 2020) (рис. 1, в), утворює гідрофобні взаємодії з Met134, Arg135, Tyr158 та водневі зв'язки з Tyr114, Lys165 та Arg135, тоді як сполука 41В (рис. 1, г) бере участь у гідрофобних взаємодіях з Met134 і Tyr158 та утворює водневі зв'язки з Tyr114, Lys165, Ser145 та Ser159. Сполука 46 (рис. 1, д) бере участь у гідрофобних взаємодіях з Met134, Arg135 та утворює звичайні водневі зв'язки з Tyr114, Lys165, Ser145, Val148, а також слабкі вуглецеві водневі взаємодії з Ser145, Ser159 та Asn157. Сполука 72 (рис. 1, е) утворює тісні гідрофобні взаємодії з Met134, Arg135, Tyr158 і Tyr114 та утворює водневі зв'язки з Tyr114 і Val148, тоді як сполука 89 (рис. 1, є) бере участь у гідрофобних взаємодіях з Met134, Arg135 і Tyr158 та утворює водневі зв'язки з Tyr114. Важливо зазначити, що бром-фенільний замісник у сполуці 89 не взаємодіє з амінокислотними залишками в активному центрі ферменту і повинен бути замінений для підвищення ефективності зв'язування. Таким чином, сполуки 41, 41В, 46, 72 та 89 були відібрані для дослідження їх цитотоксичності та ефективності *in vitro*.

Цитотоксичні властивості потенційних нуклеозидних інгібіторів MGMT порівняно з O⁶-бензилгуаніном. З метою оцінки цитотоксичності потенційних інгібіторів було проведено МТТ-тест та модифікований клоногенний тест. Результати МТТ-тесту показують відсоток метаболічно активних клітин Нер-2 після обробки різними інгібіторами MGMT у

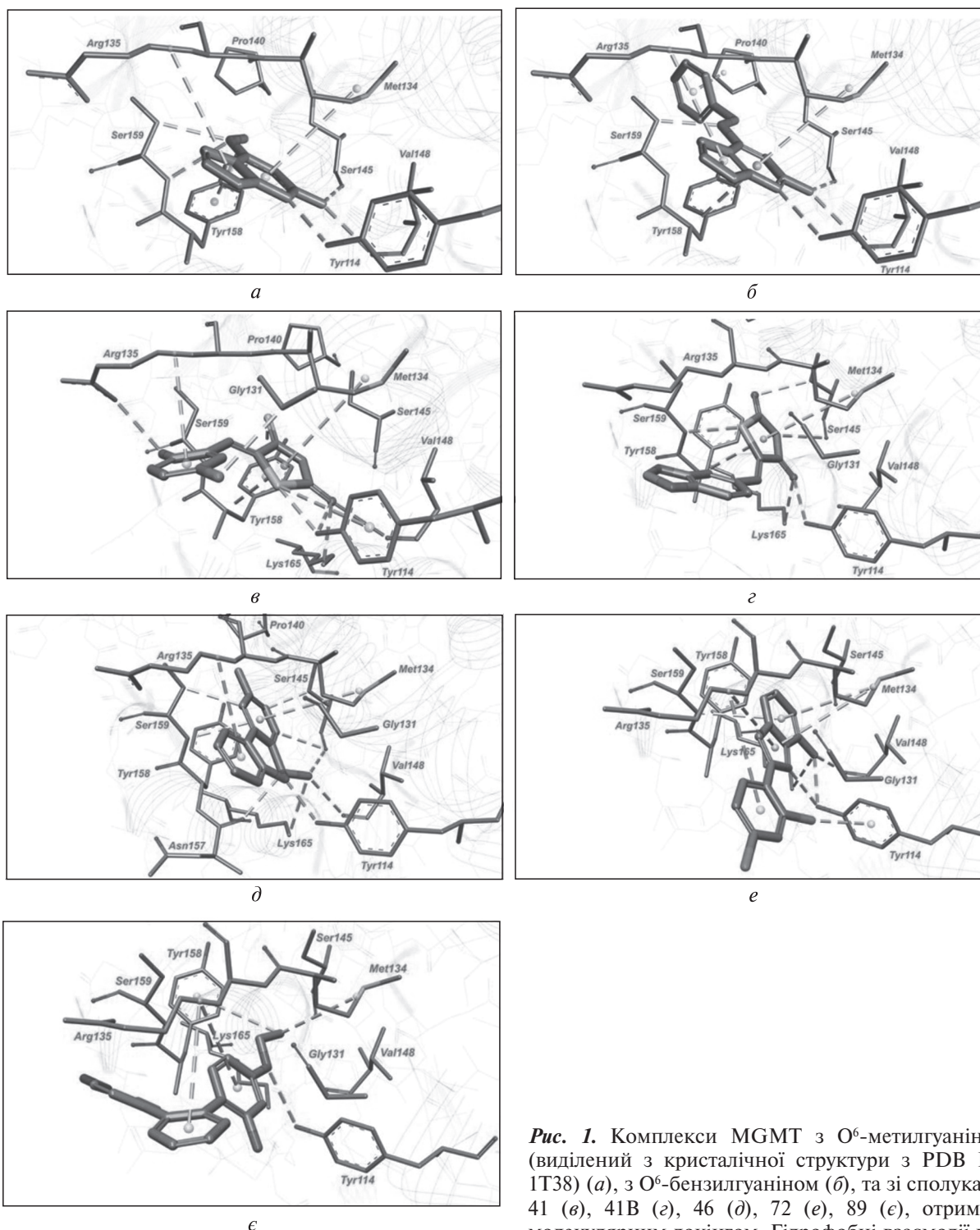


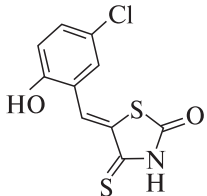
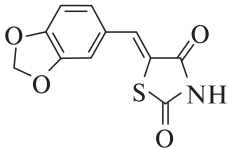
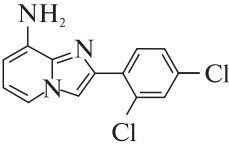
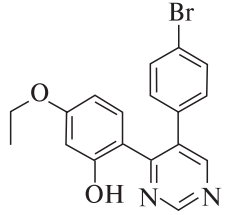
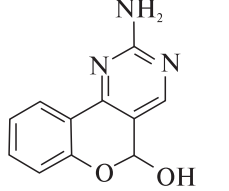
Рис. 1. Комплекси MGMT з O⁶-метилгуаніном (виділений з кристалічної структури з PDB ID: 1T38) (а), з O⁶-бензилгуаніном (б), та зі сполуками 41 (в), 41В (г), 46 (д), 72 (е), 89 (є), отримані молекулярним докінгом. Гідрофобні взаємодії позначені фіолетовими пунктирними лініями, водневі зв'язки – зеленими пунктирними лініями, вуглець-водневі взаємодії – світло-зеленими пунктирними лініями, π-Сульфур взаємодії – оранжевими пунктирними лініями, акцептор-акцепторні взаємодії – червоними пунктирними лініями

значені фіолетовими пунктирними лініями, водневі зв'язки – зеленими пунктирними лініями, вуглець-водневі взаємодії – світло-зеленими пунктирними лініями, π-Сульфур взаємодії – оранжевими пунктирними лініями, акцептор-акцепторні взаємодії – червоними пунктирними лініями

концентрації 10 мкМ. Контрольну групу, яка не була оброблена жодним інгібітором, було взято зі 100 % життєздатних клітин (рис. 2).

Серед досліджуваної групи сполук найбільший відсоток метаболічно активних клітин (98,56 %) мав стандартний інгібітор – О⁶-бензилгуанін (БГ), далі йшли 89 (93,52 %), 41В (90,27 %) та 41 (89,10 %), які достовірно не відрізнялися від контролю (рис. 2). Отже, за результатами МТТ-тесту сполуки 89, 41, 41В майже не пригнічують метаболічну активність

Досліджувані сполуки. Номери (41, 41В, 72, 89, 46) використовуються як короткі назви сполук

Структурна формула	Назва сполуки
	5-(5-Хлоро-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он
41	
	5-Бензо[1,3]діоксол-5-ілметилен-тіазолідин-2,4-діон
41В	
	2-(2,4-Дихлоро-феніл)-імідазо[1,2-а]піридин-8-іамін
72	
	2-[5-(4-Бromo-феніл)-піримідин-4-іл]-5-етокси-фенол
89	
	3-Аміно-10Н-9-окса-2,4-діаза-фенантрен-10-ол
46	

клітин НЕр-2 у концентрації 10 мкМ і практично не виявляють цитотоксичних властивостей. У той же час, потенційний інгібітор 46 мав найнижчий відсоток метаболічно активних клітин (64,19 %). Отже, сполуки 46 і, можливо, 72 є досить цитотоксичними серед досліджуваних сполук.

Для визначення цитотоксичності сполук також було проведено клоногенний тест з потенційними інгібіторами за концентрації 10 мкМ. Результати порівнювали зі стандартним інгібітором БГ. Цей метод дозволяє виміряти кількість живих клітин, які здатні утворювати колонії, що свідчить про те, що важливі клітинні процеси та молекули збереглися в неушкодженному стані. З іншого боку, клоногенний метод також дозволяє оцінити цитотоксичність досліджуваних сполук, яку можна спостерігати за зменшенням кількості утворених клітинних колоній. Таким чином, отримані результати показали, що всі досліджувані сполуки мають низький рівень цитотоксичності в клітинах НЕр-2 за концентрації 10 мкМ (рис. 3).

Слід зазначити, що статистично значущої різниці між БГ та іншими потенційними інгібіторами, протестованих у клоногенному аналізі, не було виявлено. Виходячи з цих результатів, обробка клітин НЕр-2 інгібітором БГ призвела до утворення 88 % колоній порівняно з контролем. Обробка потенційним інгібітором 41 призвела до ще вищого рівня колонієутворення – 94,1 % порівняно з контролем, що свідчить про те, що ця сполука практично не має цитотоксичності. У той же час, його аналог 41В демонстрував нижчий рівень колонієутворення – 83,7 %, що свідчить про дещо підвищену цитотоксичність порівняно з 41. Утворення колоній при обробці іншими потенційними інгібіторами коливалося від 77,7 до 81,1 %, що вказує на те, що сполуки 72, 89 та 46 можуть бути більш цитотоксичними в цій групі досліджуваних сполук. Проте, в цілому всі потенційні інгібітори не виявляли явних цитотоксичних властивостей при порівнянні зі стандартним інгібітором БГ у концентрації 10 мкМ (рис. 3).

Результати обох тестів загалом підтверджують один одного, оскільки сполуки суттєво не відрізняються за цитотоксичністю. Сполуки 41 і 41В не виявляли цитотоксичної дії в кло-

ногенному тесті та не пригнічували метаболічну активність клітин у МТТ-тесті порівняно з БГ. Інгібітор 89 не відрізнявся від них за впливом на рівень колонієутворення клітин в клонігенному тесті, але виявляв найменшу цитотоксичність за даними МТТ-тесту, оскільки метаболічна активність клітин була найвищою. Потенційний інгібітор 72 продемонстрував тенденцію до низької цитотоксичності та слабого пригнічення метаболічної активності клітин. Потенційний інгібітор 46 пригнічував метаболічну активність клітин у МТТ-тесті, хоча не відрізнявся від інших у клонігенному тесті. На основі цих результатів можна зробити висновок, що потенційні нуклеозидні інгібітори 41, 41В, 89 і 72 є перспективними для подальших досліджень, оскільки вони не проявляють високої цитотоксичності і суттєво не пригнічують суттєво метаболічну активність клітин порівняно з БГ при концентрації 10 мкМ.

Інгібувальна активність потенційних нуклеозидних інгібіторів MGMT. Згідно з результатами клонігенного аналізу, цитотоксичний ефект алкілувального агента MNNG не спостерігається за концентрацій, нижчих ніж 0,005 мкг/мл, що можна пояснити ефективною дією репаративного ферменту MGMT у клітинах НЕР-2. Однак цитотоксична дія MNNG посилюється інгібітором БГ і трьома досліджуваними сполуками (41, 41В, 89), починаючи з найнижчої концентрації НГ (0,0005 мкг/мл), що свідчить про їхню інгібувальну активність (рис.4). Крім того, виявлено, що сполуки 41, 41В та 89 знижують рівень колонієутворення, тому можуть розглядатися як справжні інгібітори MGMT. Лише сполука 72 не знижує рівень утворення клітинних колоній і, отже, не є ефективним інгібітором ферменту MGMT.

У поєднанні з MNNG при концентрації 0,0005 мкг/мл стандартний інгібітор БГ знижує здатність клітин утворювати колонії на 8,7 %, порівняно з рівнем колонієутворення після обробок клітин лише БГ. Цей рівень зростає до 28 % за концентрації нітрозогуанідину 0,005 мкг/мл. Найменш цитотоксичний потенційний інгібітор 41 є більш ефективним інгібітором, оскільки знижує утворення клітинних колоній на 36,3 та 43,6 % у поєднанні з

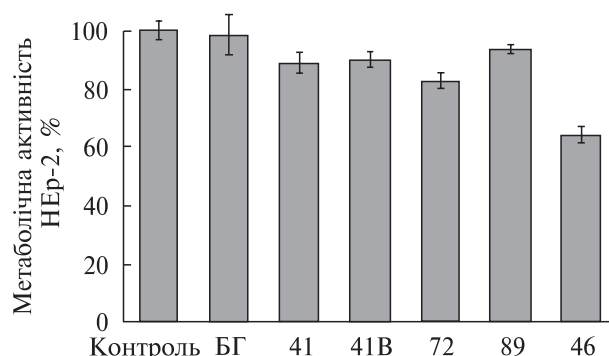


Рис. 2. Метаболічна активність клітин НЕР-2 після обробки інгібіторами MGMT у концентрації 10 мкМ, отримана за результатами МТТ-тесту. Перший стовпчик – контроль – життєздатність клітин без жодної обробки; наступні стовпчики: БГ – життєздатність після обробки O⁶-бензилгуаніном; 41, 41В, 89, 72, 46 – життєздатність після обробки потенційними інгібіторами MGMT, відповідно. Експеримент повторювали 4 рази, кожен експеримент складався з 6 ідентичних обробок, $p < 0,005$

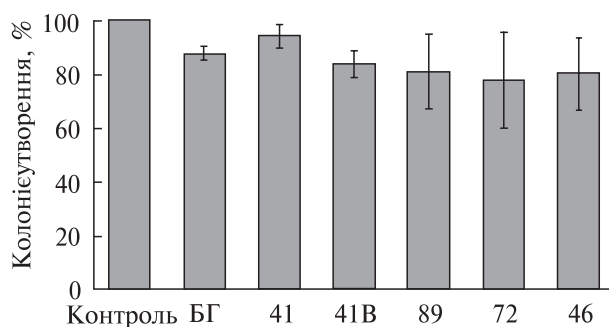


Рис. 3. Колонієутворення клітин НЕР-2 після обробки потенційними інгібіторами MGMT за концентрації 10 мкМ. Перший стовпчик – контроль – рівень утворення колоній без обробки інгібіторами; наступні стовпчики: БГ – рівень утворення колоній після обробки O⁶-бензилгуаніном; 41, 41В, 89, 72, 46 – рівень утворення колоній після обробки потенційними інгібіторами MGMT, відповідно. Експерименти повторювали 4 рази, кожен експеримент складався з 2–3 ідентичних обробок, $p < 0,05$

MNNG у концентраціях 0,0005 мкг/мл та 0,005 мкг/мл, відповідно. Потенційний інгібітор 89 демонструє ще кращі результати, пригнічуючи утворення клітинних колоній на 42,3 і 45,9 % після комбінованої обробки з MNNG у концентраціях 0,0005 мкг/мл і 0,005 мкг/мл, відповідно. Однак, слід зазначити, що цей інгібітор сам по собі має незначну цитотоксич-

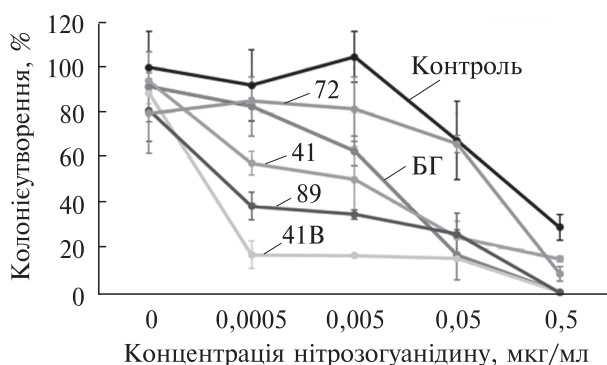


Рис. 4. Колонієутворення клітин Нер-2 після обробки стандартним інгібітором O^6 -бензилгуаніном (БГ) або потенційними інгібіторами MGMT (41, 41B, 72, 89) у комбінації з нітрозогуанідином (MNNG) в різних концентраціях. Концентрація інгібіторів – 10 мкМ. Експерименти повторювали 2 рази, кожен експеримент складався з 2 ідентичних обробок

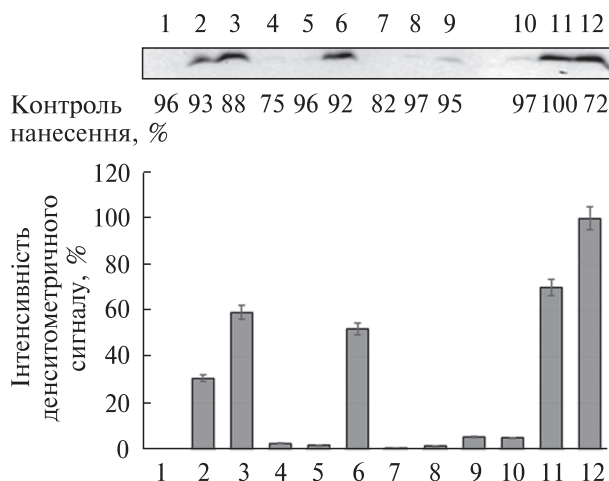


Рис. 5. Результати Вестерн-блот аналізу. Рівень білка MGMT у клітинах Нер-2 після обробки різними сполуками (на гістограмі показано результати денситометрії сигналів): (1) комбінація інгібітора 72 та нітрозогуанідину (MNNG), концентрацією 50 мкг/мл; (2) інгібітор 72 та MNNG (0,5 мкг/мл); (3) лише інгібітор 72; (4) інгібітор 89 та MNNG (50 мкг/мл); (5) інгібітор 89 та MNNG (0,5 мкг/мл); (6) лише інгібітор 89; (7) БГ та MNNG (50 мкг/мл); (8) БГ та MNNG (0,5 мкг/мл); (9) лише БГ; (10) MNNG (50 мкг/мл); (11) MNNG (0,5 мкг/мл); (12) контроль – без обробок. Всі інгібітори використовували в концентрації 10 мкМ. Експеримент повторювали 2 рази, кожен експеримент мав 3 технічні повтори

ність. Він проявляє більшу цитотоксичність, ніж інші досліджувані сполуки, за винятком сполуки 72, яка, очевидно, не є інгібітором MGMT (рис. 4). Зрештою, потенційний інгібітор 41B виявився найефективнішим, оскільки він знижує здатність клітин утворювати колонії на 71,4 та 71,6 % у поєднанні з алкілюючим агентом у концентраціях 0,0005 мкг/мл та 0,005 мкг/мл, відповідно.

На наступному етапі дослідження ми вимірювали кількість білка MGMT в клітинах Нер-2 після обробки потенційними інгібіторами за допомогою Вестерн-блот аналізу. Клітини Нер-2 мають високий рівень білка MGMT після 48–72 год культивування *in vitro* (Kotsarenko et al, 2013; Kotsarenko et al, 2018). Тому всі обробки проводили після декількох днів культивування клітин. Контрольний рівень білка MGMT в клітинах Нер-2 був визначений за допомогою Вестерн-блотингу. Співвідношення білка MGMT до загального вмісту білка використовували як контроль у проведених експериментах (рис. 5, доріжка 12 та рис. 6, доріжка 12).

Інтенсивність денситометричного сигналу (загальне білкове нанесення) зразка розглядали як контроль нанесення. Виявлені сигнали на мембранах нормалізували за допомогою денситометричного аналізу.

Експериментальні дані, представлені на рис. 5 (доріжка 11) та рис. 6 (доріжка 11), демонструють, що MNNG у відносно низькій концентрації (0,5 мкг/мл) має незначний вплив на кількість білка MGMT в оброблених ним клітинах. Однак при збільшенні концентрації MNNG до 50 мкг/мл спостерігається різке зниження вмісту білка MGMT (рис. 5, доріжка 10 і рис. 6, доріжка 10). Це явище можна пояснити виснаженням репаративного білка MGMT внаслідок інтенсивної ферментативної активності після впливу MNNG, що особливо помітно при великих дозах алкілюючого агента.

Обробка клітин інгібітором БГ призводила до помітного зниження рівня білка MGMT, про що свідчать експериментальні дані, представлені на рис. 5 (доріжка 9) та рис. 6 (доріжка 9). Крім того, додавання MNNG в обох дозах посилювало цей ефект (доріжки 7–8 на рис. 5 і 6).

Після обробки клітин новими інгібіторами спостерігається майже вдвічі нижчий рівень білка порівняно з контролем (рис. 5 (доріжки 3,

б) та рис. 6 (доріжки 3, 6)). Цей ефект не такий значний, як після обробки стандартним інгібітором БГ, але все ж таки суттєвий і демонструє інгібувальні властивості досліджуваних сполук. MNNG посилює ефект досліджуваних сполук, так само як і стандартного інгібітора БГ. Проте, комбінована дія кожного інгібітора та MNNG є різною. Єдиною схожістю є різке зниження MGMT за комбінації інгібітора з MNNG у високих дозах.

Клітини, оброблені лише інгібітором 41В, демонстрували нижчий рівень білка MGMT порівняно з його аналогом 41 та іншими досліджуваними нуклеозидними сполуками. Інгібітор 89 виявився ефективнішим за 72, хоча останній також знижував кількість MGMT у поєднанні з MNNG. Низький вміст білка MGMT можна пояснити значною інгібувальною активністю сполуки 41, її аналога 41В та 89 порівняно з БГ. Це корелює з результатами клоногенного аналізу, згідно з якими ці інгібітори за своєю дією подібні до стандартного інгібітора БГ. Крім того, результати Вестерн-блот аналізу підтвердили, що потенційний інгібітор 72 практично не виявляє інгібувальної активності, так само як і в клоногенному тесті, де дана сполука була неефективною.

Ще одне цікаве спостереження: за результатами Вестерн-блот-аналізу, який дозволяє візуалізувати кількість MGMT, БГ продемонстрував кращий інгібувальний ефект порівняно з іншими досліджуваними сполуками. Однак, за результатами клоногенного тесту стандартний інгібітор БГ виявився найменш ефективним. Очевидно, дані методи відрізняються за здатністю виявляти різні аспекти впливу сполук та їхню взаємодію з репаративним ферментом. З цього випливає необхідність подальших досліджень, які б дозволили отримати більше інформації щодо механізмів інгібування MGMT сполуками нуклеозидної природи. Різниця в механізмах дії між БГ та новими нуклеозидними інгібіторами може пояснити результати, які описані в даній роботі.

Обговорення результатів. На сьогоднішній день алкілувальна хіміотерапія залишається одним з основних методів лікування низки онкологічних захворювань. Репаративний фермент MGMT вважається одним з найважливіших мо-

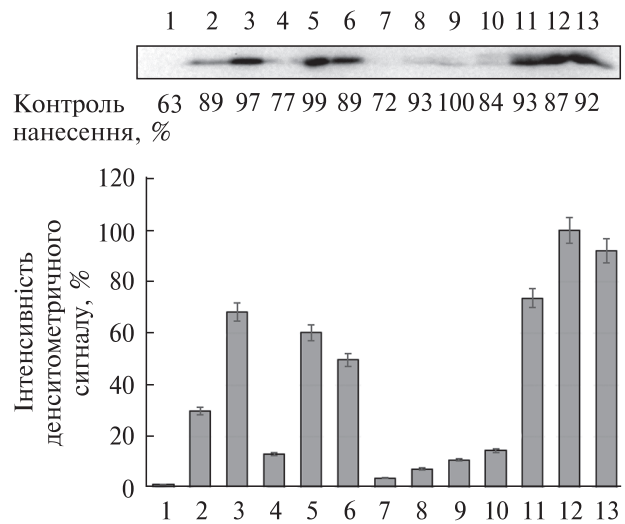


Рис. 6. Результати Вестерн-блот аналізу. Рівень білка MGMT у клітинах HEp-2 після обробки різними сполуками (на гістограмі показано результати денситометрії сигналів): (1) комбінація інгібітора 41 та MNNG (50 мкг/мл); (2) інгібітор 41 та MNNG (0,5 мкг/мл); (3) лише інгібітор 41; (4) інгібітор 41В та MNNG (50 мкг/мл); (5)) інгібітор 41В та MNNG (0,5 мкг/мл); (6) лише інгібітор 41В; (7) БГ та MNNG (50 мкг/мл); (8) БГ та MNNG (0,5 мкг/мл); (9) лише БГ; (10) MNNG (50 мкг/мл); (11) MNNG (0,5 мкг/мл); (12) контроль – без обробки; (13) ДМСО. Всі інгібітори використовували в концентрації 10 мкМ. Експеримент повторювали 2 рази, кожен експеримент мав 3 технічні повтори

лекулярних маркерів, який перевіряють перед введенням алкілувальних препаратів до схеми хіміотерапії для прогнозування її ефективності. Саме завдяки функціонуванню MGMT відбувається формування резистентності пухлин до алкілувальних препаратів. Таким чином, шляхом модуляції MGMT зовнішніми факторами, такими як нуклеозидні інгібітори (БГ та його аналоги), можна підвищити ефективність лікування, зменшуючи кількість активного ферменту з метою нанесення максимальної пошкоджуючої дії алкілувальної сполуки на пухлину при одночасному зниженні її дози, тобто зменшення токсичного впливу як для пухлинних, так і для нормальних клітин. Мутагенні ефекти були продемонстровані на моделі фібробластів людини *in vitro* з використанням комбінації БГ та MNNG, а також кожного окремо (Lukash et al, 1991).

Як зазначалося вище, на третьому етапі клінічних досліджень було виявлено, що систематичне застосування відомих нуклеозидних інгібіторів спричиняє значний токсичний вплив на організм, особливо на гематопоетичні клітини. Це спонукало дослідників до пошуку ефективних нетоксичних інгібіторів MGMT ненуклеозидної природи, а також до вивчення механізмів, які регулюють активність та експресію MGMT. Метою нашої попередньої роботи двох відділів (біомедичної хімії та генетики людини ІМБГ НАН України) було дослідити можливий терапевтичний ефект нових ненуклеозидних інгібіторів репаративного ферменту MGMT у поєднанні з алкілюючою сполукою нітрозогуанідином та встановити їх вплив на кількість білка MGMT у модельних системах. Раніше нами було розроблено та запатентовано комбінований метод виявлення низькомолекулярних сполук, здатних посилювати цитотоксичну дію нітрозогуанідину (Volynets et al, 2018).

На початковому етапі дослідження за допомогою методу напівгнучкого докінгу з колекції близько 100 000 сполук було відібрано лише 89, які потенційно здатні взаємодіяти з активним центром репаративного ферменту MGMT. Після попереднього біохімічного скринінгу в безклітинному середовищі було протестовано та відібрано двадцять сполук з інгібувальною активністю щодо MGMT. Потім ці сполуки тестували в клоногенному тесті на клітинах пухлинного походження людини *in vitro*. В результаті досліджень було виявлено лише кілька сполук, які продемонстрували підсилення цитотоксичної дії нітрозогуанідину, що імітує умови хіміотерапії із застосуванням комбінації препаратів. Слід зазначити, що ці сполуки були більш ефективними і діяли в ширшому діапазоні концентрацій порівняно з відомим інгібітором БГ. Одна зі них, а саме 5-(5-хлор-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-он (сполука 41), була запатентована нами раніше (Volynets et al, 2020).

Це дослідження присвячене вивченню цитотоксичності та ефективності п'яти нових потенційних інгібіторів. Ці сполуки мають низьку молекулярну масу і мають ненуклеозидну природу, що може свідчити про нижчу цитотоксичність, оскільки вони не імітують важливий

і поширений клітинний субстрат. Саме тому в результаті їхнього застосування очікується менш руйнівний вплив на клітини. Однак існує ймовірність, що вони можуть мати інший механізм дії або взаємодіяти не лише з білком-мішенню – MGMT. Тому вони потребують детального вивчення.

На сьогоднішній день основним підходом до створення нових інгібіторів MGMT є синтез аналогів БГ. Серед похідних гуаніну були отримані наступні інгібітори MGMT: O⁶-(4-Y-бензил)гуанін (Y = H, F, Cl, CH₃), O⁶-бензил-2'-дезоксигуанозин, O⁶-(4-Y-бензил)гуанозин (Y = H, Cl, CH₃), 9-заміщені БГ похідні, O⁶-алілгуанін, O⁶-бензилгіпоксантин, O⁶-метилгуанін (Moschel et al, 1992), N⁹-заміщений БГ, N²-ацетил-O⁶-БГ, O⁶-бензил-7-МГ, O⁶-(2-піридилметил)гуанін (Chae et al, 1994), 8-бром-O⁶-БГ, 8-аза-O⁶-БГ (Chae et al, 1995), O⁶-(гетарилметил)гуанін (McElhinney et al, 1998), O⁶-циклоалкілгуанін, O⁶-(циклоалкеніл)гуанін (Griffin et al, 2000), амінометил- та метилзаміщені похідні БГ (Pauly et al, 2008). Також серед похідних піримідину були вивчені наступні інгібітори MGMT: 6-(бензилокси)піримідин (Chae et al, 1995), 4(6)-(бензилокси)-2,6(4)-діаміно-5-(нітро- або нітрозопіримідин (Terashima et al, 1998), 2-аміно-6-арилокси-5-нітропіримідин з морфоліно- та амінодіарилзамісниками (Lopez et al, 2011), триазоло-піримідин (Ruiz et al, 2008). Недоліками БГ та його похідних є погана розчинність у воді, що знижує їх біодоступність, та швидкий плазмований кліренс (Dolan et al, 1994).

У літературі згадується лише декілька ненуклеозидних інгібіторів MGMT – похідні хінолінону (Ruiz et al, 2008) та хлорметилтриазолу (Wang et al, 2016). На жаль, в літературних джерелах бракує інформації щодо токсичності цих сполук. Ще одним недоліком є те, що похідні хінолінону показали низьку активність при тестуванні на клітинній лінії НТВ-38, що може свідчити про погану проникність через клітинну мембрану (Ruiz et al, 2008).

На початковому етапі нашого дослідження ми зосередилися на оцінці цитотоксичних властивостей нових потенційних інгібіторів. Для аналізу цитотоксичних ефектів цих сполук ми використовували два різні методи, а саме МТТ-тест та клоногенний тест. Результати

обох методів показали, що всі досліджувані сполуки проявляють низьку цитотоксичність за концентрації 10 мкМ.

Другим аспектом цієї роботи була оцінка ефективності досліджуваних сполук. Для цього ми використали два різні методи: клоногенний тест та Вестерн-блот аналіз. Результати, отримані за допомогою обох методів, підтвердили, що нові інгібітори, 41В та 89, є найбільш ефективними. Для адекватної оцінки ефективності інгібіторів було також враховано вплив MNNG. Дослідження показало, що збільшення концентрації MNNG, починаючи з 0,05 мкг/мл, призводило до зниження здатності клітин до утворення колоній. Скоріш за все, це було пов'язано з виснаженням ферменту MGMT, що було підтверджено результатами Вестерн-блот аналізу. Ці результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, в яких MNNG індукував пошкодження ДНК, що призводило до зниження життєздатності клітин та їхньої здатності до колонієутворення (Arslan et al, 2016; Mohanty et al, 2019; Zhang et al, 2019). Ми використовували той самий діапазон концентрацій MNNG, що і в попередніх в цій роботі, спрямованій на вивчення впливу MNNG на життєздатність клітин і колонієутворення. Отже, було встановлено оптимальну концентрацію MNNG, яку використовували для оцінки ефективності досліджуваних сполук, беручи до уваги цитотоксичну дію самого алкілувального агента.

Висновки. Отже, в рамках даної роботи було досліджено низку сполук стосовно їхньої потенційної здатності бути інгібіторами репаративного ферменту MGMT. Дослідження були спрямовані на визначення їхньої цитотоксичності та ефективності *in vitro*. Результати показали, що сполуки 5-(5-Хлоро-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он (41), 5-Бензо[1,3]діоксол-5-ілметилен-тіазолідин-2,4-діон (41В) та 2-[5-(4-Бromo-феніл)-піримідин-4-іл]-5-етокси-фенол (89) мають нижчу цитотоксичність та вищу ефективність порівняно зі стандартним інгібітором БГ за концентрації 10 мкМ.

Дотримання етичних стандартів. Всі досліді проведені з урахуванням етичних стандартів. Експерименти відбувались без участі тварин та людей.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

ACTIVITY OF NON-NUCLEOSIDE INHIBITORS OF O⁶-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE REPAIR ENZYME IN HUMAN CELLS *IN VITRO*

K. Zhuvaka, G. Volynets, T. Ruban,
Z. Nidoeva, A. Iatsyshyna, L. Macewicz,
V. Bdzhol, S. Yarmoluk, L. Lukash

Department of Human Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150 Akad. Zabolotnogo str, Kyiv, 03680, Ukraine
Department of Biomedical Chemistry, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150 Akad. Zabolotnogo str, Kyiv, 03680, Ukraine

E-mail: kateopryshko@gmail.com,
g.p.volynets@gmail.com, tullip@ukr.net,
zarinanidoeva@gmail.com, yazishinaa@yahoo.com,
macewicz71@gmail.com, bdzhol@gmail.com,
serhiy.yarmoluk@gmail.com, luKash.imbg@gmail.com

One of the way to enhance the efficiency of alkylating chemotherapy is reducing the level of the repair enzyme MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) in cancer cells. The standard MGMT inhibitor, O⁶-benzylguanine (BG), has exhibited cytotoxicity towards hematopoietic cells in the third stage of clinical trials, making the search for new alternative inhibitors relevant. In this study, we have conducted research to determine the cytotoxicity and efficacy of new potential MGMT inhibitors, which were modeled using molecular flexible docking. At the first stage of the study, MTT and clonogenic assays were performed to assess cytotoxicity, in which HEP-2 cells were cultured with the tested compounds at a concentration of 10 μM. At the second stage, the efficacy of the compounds was evaluated. One of the methods used was a clonogenic assay, in which the cell treatment consisted of combinations of the tested compounds (10 μM) and the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) at different concentrations. Another method was Western blot analysis, for which proteins were extracted from HEP-2 cells treated with potential inhibitors in combination with MNNG. The obtained results were analyzed in Microsoft Excel 2016, Origin8.1 and ImageLab. As a result, 4 of the 5 examined compounds demonstrated low cytotoxicity at a concentration of 10 μM in HEP-2

cells compared to the standard inhibitor BG. According to the clonogenic assay, compound 41B (5-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-thiazolidin-2,4-dione) was the most effective, and compounds 41 (5-(5-Chloro-2-hydroxy-benzylidene)-4-thioxo-thiazolidin-2-one) and 89 (2-[5-(4-Bromo-phenyl)-pyrimidin-4-yl]-5-ethoxy-phenol) also showed high efficiency. The results of Western blot analysis showed a significant decrease in MGMT protein after treatment with compounds 41, 41B and 89, thereby confirming the inhibitory properties of these compounds.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Arslan FT, Yurdakok-Dikmen B, Akgedik R, Topcu G (2016) Nitrosoguanidine-induced genotoxicity and oxidative stress in human gastric adenocarcinoma cells. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen* 797:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.09.001>
- Chae M-Y, Swenn K, Kanugula S, Dolan ME, Pegg AE, Moschel RC (1995) 8-Substituted O6-Benzylguanine, Substituted 6(4)-(Benzyloxy)pyrimidine, and Related Derivatives as Inactivators of Human O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *J Med Chem* 38(2):359–365. <https://doi.org/10.1021/jm00002a018>
- Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B (2011) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Reviews on Cancer* 1816(2): 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.06.002>
- Dolan M, Chae M, Pegg A et al (1994) Metabolism of O6-benzylguanine, an inactivator of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res* 54(19): 5123–5130. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2047>
- Green SJ, Michael R (2012) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN: 978-1936113422
- Griffin RJ, Arris CE, Bleasdale C, Boyle FT, Calvert AH, Curtin NJ, Dalby C, Kanugula S, Lembicz NK, Newell DR, Pegg AE, Golding BT (2000) Resistance-Modifying Agents. 8. Inhibition of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase by O6-Alkenyl-, O6-Cycloalkenyl-, and O6-(2-Oxoalkyl)guanines and Potentiation of Temozolomide Cytotoxicity in Vitro by O6-(1-Cyclopentylmethyl)guanine. *J Med Chem* 43(22):4071–4083. <https://doi.org/10.1021/jm000961o>
- Kaina B, Margison GP, Christmann M (2010) Targeting O6-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 67(21):3663–3681. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0491-7>
- Kotsarenko KV, Lylo VV, Macewicz LL, Dasyukevich OI, Poltoratskaya LV, Burkovskaya TE (2013) Changes in the MGMT Gene Expression under the Influence of Exogenous Cytokines in Human Cells In Vitro. *Cytol Genet* 47(4):202–209. <https://doi.org/10.3103/S0095452713040087>
- Kotsarenko K, Lylo V, Ruban T, Macewicz L, Lukash L (2018) Effects of Some Growth Factors and Cytokines on the Expression of the Repair Enzyme MGMT and Protein MARP in Human Cells In Vitro. *Biochem Genet* <https://doi.org/10.1007/s10528-018-9854-9>
- Lipinski CA (2004) Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 1 (4):337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Lopez S, Margison GP, McElhinney RS, Cordeiro A, McMurry TBH, Rozas I (2011) Towards more specific O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) inactivators. *Bioorgan Med Chem* 19(5):1658–1665. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.01.038>
- Lukash LL, Bodt J, Pegg AE, Dolan ME, Maher VM, McCormick J (1991) Effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Mutat Res* 250(12):397–409. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90196-U](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90196-U)
- McElhinney R, Donnelly D, McCormick A et al (1998) Inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. 1. Novel O6-(hetaryl)methyl)guanines having basic rings in the side chain. *J Med Chem* 41(26):5265–5271. <https://doi.org/10.1021/jm9804388>
- Mitra S (2007) MGMT: a personal perspective. *DNA repair* 6(8):1064–1070. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.03.007>
- Mohanty S, Sharma P, Gupta PK, Chatterjee S (2019) Nitrosoguanidine-induced DNA damage response in *Escherichia coli* cells. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen* 842:18–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.006>
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computat Chem* 16:2785–2791.
- Moschel RC, McDougall M, Dolan ME, Pegg AE, Phillips DR (1992) Structural features of substituted purine derivatives compatible with depletion of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *J Med Chem* 35(23):4486–4491. <https://doi.org/10.1021/jm00103a019>
- Oshiro S, Tsugu H, Komatsu F, Ohmura T, Ohta M, Sakamoto S, Fukushima T, Inoue T (2009) Efficacy of Temozolomide Treatment in Patients with High-

- grade Glioma. *Anticancer Res* 29:911–918. <https://ar.iarjournals.org/content/29/3/911.full>
- Pauly G, Loktionova N, Fang Q et al (2008) Substitution of aminomethyl at the meta-position enhances the inactivation of O⁶ 20 -alkylguanineDNA alkyltransferase by O⁶-benzylguanine. *J Med Chem* 51(22):7144–7153. <https://doi.org/10.1021/jm800758y>
- Pedretti A, Mazzolari A, Gervasoni S, Fumagalli L, Vistoli G (2021) The vega suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects. *Bioinformatics* 37(8):1174–1175. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa774>
- Pegg AE (2000) Repair of O (6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462(2–3):83–100. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(00\)00017-x](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00017-x)
- Pegg AE (2011) Multifaceted Roles of Alkyltransferase and Related Proteins in DNA Repair, DNA Damage, Resistance to Chemotherapy, and Research Tools. *Chem Res Toxicol* 24(5):618–639. <https://doi.org/10.1021/tx200031q>
- Quinn JA, Jiang SX, Carter J, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Friedman HS (2009) Phase II Trial of Gliadel plus O⁶-Benzylguanine in Adults with Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Clin Cancer Res* 15(3):1064–1068. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2130>
- Ranson M (2006). Lomeguatrib, a Potent Inhibitor of O⁶-Alkylguanine-DNA-Alkyltransferase: Phase I Safety, Pharmacodynamic, and Pharmacokinetic Trial and Evaluation in Combination with Temozolomide in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 12(5):1577–1584. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-05-2198>
- Ruiz F, Gil-Redondo R, Morreale A et al (2008) Structure-based discovery of novel non-nucleosidic DNA alkyltransferase inhibitors: virtual screening and in vitro and in vivo activities. *J Chem Inform Model* 48(10):1972–1982. <https://doi.org/10.1021/ci800202t>
- Sharma S, Salehi S, Yang Y, Vessella RL (2009) Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res* 29(10):3759–3768. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.012>
- Terashima I, Kohda K (1998) Inhibition of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and potentiation of the cytotoxicity of chloroethylnitrosourea by 4(6)-(benzyloxy)-2,6(4)-diamino-5-(nitro or nitroso)pyrimidine derivatives and analogues. *J Med. Chem* 41(4):503–508. <https://doi.org/10.1021/jm970712f>
- Verbeek B, Southgate TD, Gilham DE, Margison GP (2008) O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *British Med Bull* 85(1):17–33 <https://doi.org/10.1093/bmb/ldm036>
- Volynets GP, Ruban TP, Yatsyshina AP, Matsevich LL, Bdzhola VG, Yarmolyuk SM, Lukash LL (2018) The method of identifying new inhibitors of the reparative enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase for use in cancer chemotherapy. Utility model patent No. 127059. Publ. 10.07.2018. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=2.492.48>
- Volynets GP, Yatsyshina AP, Ruban TP, Matsevich LL, Nidoyeva ZM, Balanda AO, Bdzhola VG, Yarmolyuk SM, Lukash LL (2020) Use of the compound 5-(5-chloro-2-hydroxybenzylidene)-4-thioxothiazolidin-2-one as an MGMT inhibitor. Patent of Ukraine for the invention No. 122373. Publ. 26.10.2020. Bul. No. 20. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=271905>
- Wang C, Abegg D, Hoch D, Adibekian A (2016) Chemo-proteomics-enabled discovery of a potent and selective inhibitor of the DNA repair protein MGMT. *Angewandte Chemie International Edition* 55(10):2911–2915. <https://doi.org/10.1002/anie.201510203>
- Yu W, Zhang L, Wei Q, Shao A (2020) O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Front Oncol* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01547>
- Zhang X, Zhou Y, Hu Y, Huang P (2019) Nitrosoguanidine-induced DNA damage and cell cycle arrest in human liver cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 68:66–71. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.012>

Надійшла в редакцію 01.07.23
Після доопрацювання 03.08.23
Прийнята до друку 18.11.23