

Хемореактомный скрининг цитотоксических эффектов аквабаламина и гептаметилового эфира цианоаквакобириновой кислоты на опухолевые клетки с экспериментальными подтверждениями на линиях клеток ВТ-474 и А549

И.Ю. Торшин¹, М.В. Филимонова², О.А. Громова¹, Л.А. Майорова¹, М.А. Сорокина³, Д.Е. Фролова⁴, А.Н. Громов¹, И.А. Рейер¹

¹ *Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук (ул. Вавилова, д. 44, корп. 2, Москва 119333, Россия)*

² *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Маршала Жукова, д. 10, Обнинск 249031, Россия)*

³ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Островитянова, д. 1, Москва 117997, Россия)*

⁴ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Шереметевский пр-т, д. 8, Иваново 153012, Россия)*

Для контактов: Ольга Алексеевна Громова, e-mail: unesco.gromova@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Поиск эффективной и безопасной фармакотерапии опухолевых заболеваний включает оценку влияния молекул-кандидатов на различные типы

Мы предоставляем данную авторскую версию для обеспечения раннего доступа к статье. Эта рукопись была принята к публикации и прошла процесс рецензирования, но не прошла процесс редактирования, верстки, присвоения порядковой нумерации и корректуры, что может привести к различиям между данной версией и окончательной отредактированной версией статьи.

We are providing this an author-produced version to give early visibility of the article. This manuscript has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the final typeset and edited version of the article.

опухолевых клеток. Витамин В12 и его производные – перспективные биологически активные соединения, свойства которых могут регулироваться посредством модификации их химической структуры.

Цель: проведение хемореактомного скрининга *in silico* и экспериментального исследования цитотоксической активности *in vitro* аквакобаламина и гептаметилового эфира цианаквакобириновой кислоты (ГЭЦАКК).

Материал и методы. Хемореактомный скрининг проводили на основании проблемно-ориентированной теории анализа изоморфизма хемографов, которая является расширением алгебраического подхода к задачам машинного обучения и распознавания. Использовали обучаемые алгоритмы вычисления химических расстояний между молекулами, на основе которых вычислялись значения констант полуингибирования (IC50). Скрининг выполнен для 470 культур опухолевых клеток человека, в т.ч. клеточных линий SNB19 (астроцитомы), НСТ116 (рак толстой кишки), HeLa (карцинома шейки матки), BT-474 (карцинома протока молочной железы), A549 (карцинома легкого). Синтез изучаемого в работе гидрофобного производного витамина В12 был проведен Д.С. Сальниковым. Гептаметиловый эфир дицианокобириновой кислоты ((CN)2Cby(OCH3)7) получали кипячением раствора витамина В12 метанол / серная кислота (1,0 М) в течение 4 сут. ГЭЦАКК ((CN)(H2O)Cby(OCH3)7) получали путем вакуумной сушки водного раствора (CN)2Cby(OCH3)7 (рН 4,0 и 25 °С). Строение и чистота эфира подтверждены данными ядерного магнитного резонанса 1H, элементным анализом, масс-спектрометрией MALDI-ToF (англ. matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight). Экспериментальные исследования культур опухолевых клеток проводили посредством МТТ-теста с аквакобаламином и ГЭЦАКК на клеточных линиях иммортализованных (теломеризованных) фибробластов (Фб-hTERT), карциномы легкого (A549), рака протока молочной железы (BT-474).

Результаты. Хемореактомный скрининг эффектов молекул на опухолевые клетки позволил получить оценки IC50 роста клеток для 470 линий опухолевых клеток. В зависимости от клеточной линии и молекулы производного витамина В12 значения IC50 изменялись в достаточно широком диапазоне – от 15 до 2000 нМ. Для 120 из 470 линий клеток (включая экспериментально исследованные линии A549, BT-474) противоопухолевая активность ГЭЦАКК была достоверно выше, чем для аквакобаламина. В исследованиях *in vitro* на культурах двух опухолевых клеточных линий человека (BT-474 и A549) и теломеризованных фибробластов Фб-hTERT подтверждено цитотоксическое действие аквакобаламина и его гидрофобного производного ГЭЦАКК.

Показано, что аквакобаламин обладает слабыми цитотоксическими свойствами в диапазоне концентраций 3,125–200 мкг/л (IC₅₀>200 нМ), а ГЭЦАКК заметно снижает выживаемость опухолевых линий клеток ВТ-474 и А549 при высоких концентрациях (100–200 мкг/л, IC₅₀ порядка 100 нМ).

Заключение. Показано соответствие между результатами хемореактомного скрининга *in silico* и данными исследований клеточных культур *in vitro*: значения IC₅₀ для ГЭЦАКК были существенно ниже, чем для аквакобаламина, а коэффициент пересчета с хемореактомных оценок на экспериментальные практически одинаков (2,64 для ВТ-474 и 2,63 для А549). Результаты хемореактомного скрининга для других опухолевых линий клеток могут быть использованы для планирования последующих клеточных экспериментов с производными витамина В12.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Корриновые производные, витамин В12, топологический анализ данных, фармакоинформатика, исследования на клетках в культуре.

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ

Поступила: 04.09.2023. **В доработанном виде:** 15.10.2023. **Принята к печати:** 23.11.2023. **Опубликована онлайн:** 07.12.2023.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии необходимости раскрытия конфликта интересов в отношении данной публикации.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-12-00175-п на базе ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет».

Вклад авторов

Авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Торшин И.Ю., Филимонова М.В., Громова О.А., Майорова Л.А., Сорокина М.А., Фролова Д.Е., Громов А.Н., Рейер И.А. Хемореактомный скрининг цитотоксических эффектов

аквакобаламина и гептаметилового эфира цианоаквакобириновой кислоты на опухолевые клетки с экспериментальными подтверждениями на линиях клеток BT-474 и A549. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2024; 17 (1): [Принятая рукопись]. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2023.209>.

Chemoreactome screening of aquacobalamin and heptamethyl ester of cyanoaquacobyrinic acid cytotoxic effects on tumor cells with experimental confirmation on BT-474 and A549 cell lines

I.Yu. Torshin¹, M.V. Filimonova², O.A. Gromova¹, L.A. Maiorova¹, M.A. Sorokina³, D.E. Frolova⁴, A.N. Gromov¹, I.A. Reyer¹

¹ *Federal Research Center “Computer Science and Control”, Russian Academy of Sciences (44 corp. 2 Vavilov Str., Moscow 119333, Russia)*

² *Tsyba Medical Radiological Research Center – branch of Scientific Medical Research Center of Radiology (10 Marshal Zhukov Str., Obninsk 249031, Russia)*

³ *Pirogov Russian National Research Medical University (1 Ostrovityanov Str., Moscow 117997, Russia)*

⁴ *Ivanovo State Medical Academy (8 Sheremetevskiy Ave., Ivanovo 153012, Russian Federation)*

Corresponding author: Olga A. Gromova, e-mail: unesco.gromova@gmail.com

SUMMARY

Background. The search for an effective and safe pharmacotherapy for tumor diseases includes the evaluation of the action of candidate molecules on various types of tumor cells. Vitamin B12 and its derivatives are promising molecules whose properties can be controlled through chemical modifications.

Objective: conducting *in silico* chemoreactome screening and *in vitro* experimental study of aquacobalamin and heptamethyl ester of cyanoaquacobyrinic acid (HECCA).

Material and methods. Chemoreactome screening was carried out on the basis of a problem-oriented theory of chemograph isomorphism analysis, which is an extension of the algebraic approach to machine learning and recognition problems. Trainable algorithms for calculating chemical distances between molecules were used, on the basis of which the values of half-

maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were calculated. Screening was carried out for 470 cultures of human tumor cells, including SNB19 (astrocytoma), HCT116 (colon cancer), HeLa (cervical carcinoma), BT-474 (breast duct carcinoma), and A549 (lung carcinoma) cell lines. The synthesis of the studied hydrophobic derivative of vitamin B12 was carried out by D.S. Salnikov. Dicyanocobyrinic acid heptamethyl ester ((CN)₂Cby(OCH₃)₇) was obtained by boiling a solution of vitamin B12 in methanol/sulfuric acid (1.0 M) for 4 days. HECCA ((CN)(H₂O)Cby(OCH₃)₇) was obtained by vacuum drying an aqueous solution of (CN)₂Cby(OCH₃)₇ (pH 4.0 and 25 °C). The ester structure and purity were confirmed by ¹H nuclear magnetic resonance data, elemental analysis, and MALDI-ToF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) mass spectroscopy. Experimental studies of tumor cell cultures were carried out using the MTT test with aquacobalamin and HECCA on cell lines of immortalized (telomerized) fibroblasts (Fb-hTERT), lung carcinoma (A549), and breast duct cancer (BT-474).

Results. Chemoreactome screening of the effects of molecules on tumor cells made it possible to obtain estimates of cell growth IC₅₀ for 470 tumor cell lines. Depending on cell line and vitamin B12 derivative molecule, IC₅₀ values varied in a fairly wide range: from 15 to 2000 nM. *In vitro* studies on cultures of two human tumor cell lines (BT-474 and A549) and telomerized Fb-hTERT fibroblasts confirmed the cytotoxic effect of aquacobalamin and its hydrophobic derivative HECCA. It was shown that aquacobalamin has weak cytotoxic properties in the concentration range of 3.125–200 µg/l (IC₅₀>200 nM), and HECCA significantly reduces the survival of BT-474 and A549 tumor cell lines at high concentrations (100–200 µg/l, IC₅₀ about 100 nM).

Conclusion. Correspondence was shown between the results of *in silico* chemoreactome screening and *in vitro* cell culture studies: IC₅₀ values for HECCA were significantly lower than for aquacobalamin, and the conversion factor from chemoreactome estimates to experimental ones was almost the same (2.64 for BT-474, and 2.63 for A549). The results of chemoreactome screening for other tumor cell lines can be used to plan further cell experiments with vitamin B12 derivatives.

KEYWORDS

Corrin derivatives, vitamin B12, topological data analysis, pharmacoinformatics, studies on cells in culture.

ARTICLE INFORMATION

Received: 04.09.2023. **Revision received:** 15.10.2023. **Accepted:** 23.11.2023. **Published online:** 07.12.2023.

Conflict of interests

The authors declare they have nothing to disclose regarding the conflict of interests with respect to this manuscript.

Funding

The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 20-12-00175-p on the base of Ivanovo State University of Chemistry and Technology.

Authors' contribution

The authors contributed equally to this article.

For citation

Torshin I.Yu., Filimonova M.V., Gromova O.A., Maiorova L.A., Sorokina M.A., Frolova D.E., Gromov A.N., Reyer I.A. Chemoreactome screening of aquacobalamin and heptamethyl ester of cyanoaquacobyrinic acid cytotoxic effects on tumor cells with experimental confirmation on BT-474 and A549 cell lines. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2024; 17 (1): [accepted manuscript] (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2023.209>.

Основные моменты	Highlights
Что уже известно об этой теме?	What is already known about the subject?
Витамин В12 важен для поддержания многих процессов (метаболизм фолатов, гомоцистеина, метилирование ДНК) и проявляет противоопухолевые свойства	Vitamin B12 is important for maintaining many processes (metabolism of folate, homocysteine, DNA methylation) and exerts antitumor properties
Противоопухолевые свойства производных В12 могут регулироваться посредством химических модификаций корринового ядра	Antitumor properties of B12 derivatives can be regulated through chemical modifications of the corrin core
Перспективно доклиническое изучение противоопухолевых эффектов витамина В12 и его производных <i>in silico</i> и на культурах клеток <i>in vitro</i>	Preclinical study of the antitumor effects of vitamin B12 and its derivatives <i>in silico</i> and on cell cultures <i>in vitro</i> is promising

Что нового дает статья?	What are the new findings?
Представлены результаты хемореактомного скрининга <i>in silico</i> эффектов воздействия аквакобаламина и гептаметилового эфира цианаквакобириновой кислоты (ГЭЦАКК) на 470 культур опухолевых клеток человека	The results of <i>in silico</i> chemoreactome screening of the effects of aquacobalamin and heptamethyl ester of cyanoquacobyrinic acid (HECCA) on 470 human tumor cell cultures are presented
Исследования <i>in vitro</i> на культурах двух опухолевых клеточных линиях человека (BT-474 и A549) подтвердили цитотоксическое действие аквакобаламина и ГЭЦАКК	<i>In vitro</i> studies on cultures of two human tumor cell lines (BT-474 and A549) confirmed the cytotoxic effect of aquacobalamin and HECCA
ГЭЦАКК заметно снижает выживаемость опухолевых линий клеток BT-474 и A549 при высоких концентрациях (100–200 мкг/л, IC50 порядка 100 нМ)	HECCA significantly reduces the survival of BT-474 and A549 tumor cell lines at high concentrations (100–200 µg/l, IC50 about 100 nM)
Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?	How might it impact the clinical practice in the foreseeable future?
Витамин B12 и его производные – перспективные молекулы-кандидаты, свойства которых могут регулироваться посредством химических модификаций с целью разработки безопасной фармакотерапии опухолевых заболеваний	Vitamin B12 and its derivatives are promising candidate molecules whose properties can be adjusted through chemical modifications in order to develop safe pharmacotherapy for tumors
Хемореактомный скрининг молекул <i>in silico</i> и анализ клеточных культур <i>in vitro</i> позволяют оценить клинический потенциал новых производных витамина B12	Chemoreactomic screening of molecules <i>in silico</i> and analysis of cell cultures <i>in vitro</i> allow assessing the clinical potential of new vitamin B12 derivatives

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Химиотерапия опухолей предполагает разработку и применение цитотоксических препаратов, таргетно нарушающих жизненный цикл опухолевых клеток (тормозящих деление или метастазирование, вызывающих апоптоз и др.). Очевидно, что искомые молекулы-кандидаты должны проявлять дифференцированное действие на опухолевые и нормальные клетки. Витамин B12 и его производные являются перспективными молекулами-кандидатами, свойства которых могут регулироваться посредством внесения химических модификаций [1].

Известно, что практически все витамины группы В проявляют противоопухолевые эффекты. Например, при сниженных уровнях витамина В12 в сыворотке крови у женщин в постменопаузе риск развития рака молочной железы достоверно повышается [2]. Витамин В12, тиамин, рибофлавин, фолаты играют защитную роль в отношении плоскоклеточного рака шейки матки [3]. Адьювантная терапия витаминами группы В за счет снижения гипергомоцистеинемии и уровней метилмалоната в крови уменьшает тяжелые токсические осложнения при проведении химиотерапии у пациентов с немелкоклеточным раком легкого препаратом пеметрексед [4].

Витамин В12 и его производные являются универсальными модуляторами активности протеома вследствие специфических коферментных и не-коферментных взаимодействий с белками. Витамин В12 принципиально необходим для фолатного метаболизма и обезвреживания гомоцистеина, метилирования ДНК, биосинтеза нуклеотидов, профилактики анемических состояний. Нарушения фолатного метаболизма, обезвреживания гомоцистеина, метилирования ДНК, биосинтеза нуклеотидов, возникающие на фоне дефицита витамина В12, способствуют канцерогенезу [5].

Экспериментальные и клинические исследования подтвердили противоопухолевые эффекты витамина В12, связанные с его воздействием на организм в целом. У мышей с перевиваемой эпидермоидной карциномой легких Льюиса совместное введение витаминов В1, В6, В12 сопровождалось нарастающей тенденцией торможения роста опухоли на 10–20% ($p=0,059$) [6]. Систематический анализ доказательных исследований витаминов в противоопухолевой терапии [7] показал значимое снижение опухолевых рисков при более высоких уровнях витамина В12 в сыворотке крови (отношение рисков (ОР) 0,74; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,56–0,98; $p=0,04$). Метаанализ 17 исследований ($n=10601$) продемонстрировал дозозависимую ассоциацию между диетарным потреблением витамина В12 и риском развития колоректального рака: прирост потребления витамина В12 на 4,5 мкг/сут соответствовал снижению риска заболевания на 4% (ОР 0,96; 95% ДИ 0,93–1,00, $p<0,001$) [8]. Результаты клинических исследований показывают, что взаимосвязь между низкой обеспеченностью витамином В12 и риском опухолевых заболеваний опосредуется такими факторами, как потребление красного мяса, алкоголя и дефицитом других витаминов группы В [9]. Показана перспективность использования препаратов витамина В12 в качестве адьювантной терапии у пациентов с опухолевыми заболеваниями, проходящих химиотерапию [10].

Обилие возможных модификаций витамина В12 (цианкобаламина) [1] позволяет предположить, что некоторые его производные могут проявлять еще более выраженные

противоопухолевые свойства, чем сам цианкобаламин. Фармакологические свойства молекулы цианкобаламина хорошо изучены, тогда как информация о фармакологии о синтетических производных витамина В12 весьма ограничена. Поэтому для оценки свойств перспективных синтетических производных витамина В12 и других корриноидов перспективно использовать информационную технологию хемореактомного анализа – новейшего направления постгеномной фармакологии, подразумевающего оценку биологических активностей исследуемого соединения в контексте реактома (т.е. совокупности всех известных химических реакций данного организма).

В частности, методом хемореактомного анализа была проведена оценка более 3500 биологических свойств пяти корриновых производных – цианкобаламина, аквакобаламина, гептаметилового эфира цианоаквакобириновой кислоты (ГЭЦАКК), гептаметилового эфира дицианокобириновой кислоты и стабильного желтого корриноида. Показано, что аквакобаламин и гидрофобное производное витамина В12 ГЭЦАКК можно рекомендовать для дальнейшего изучения в качестве обезболивающих, противовоспалительных средств, а также противоопухолевых средств, направленных на терапию глиобластомы, гепатобластомы и Т-клеточной лейкемии [11].

Изучение цитотоксичности производных витамина В12 важно для отбора молекул-кандидатов с онкопротекторными свойствами. Цитологический скрининг – необходимый шаг для отбора перспективных молекул и дальнейшего планирования эксперимента. Производные витамина В12 с цитологическими свойствами, направленными на определенные линии онкологических клеток, могут рассматриваться как перспективные «результативные» соединения для создания высокоэффективных лекарственных средств [12]. В экспериментах на животных установлено, что данное соединение обладает биологической активностью [12].

Органические, в т.ч. макроциклические, тетрапиррольные соединения, такие как коррины, корролы и порфирины, могут образовывать двумерные и трехмерные наноструктуры [13–17], а также наночастицы [18–20] с регулируемыми свойствами, что делает их актуальной группой веществ для изучения в качестве перспективных компонентов адресной доставки лекарств. Получены супермолекулярные наноструктуры производного витамина В12 – гептабутилового эфира цианоаквакобириновой кислоты (ГбЭЦАКК): уникальные наночастицы с сильными нековалентными межмолекулярными взаимодействиями, особыми свойствами и активностью [20]. Они были созданы как звено в цепи эволюции исходных молекул, когда при критической плотности ансамбли молекул выступают в роли нанореакторов, в которых происходит формирование наночастиц.

Показано, что полученные наночастицы ГбЭЦАКК не только воспроизводят функциональные свойства комплексов витамина В12 с белками в живых организмах и действуют как витамин В12-зависимые ферменты, но и демонстрируют важные преимущества перед витамином В12. Они более эффективны в реакциях восстановления/выделения кислорода и превращениях в другие формы [20]. Подобные наночастицы могут стать альтернативой широко используемым в медицине препаратам (в частности, витамину В12). Представляет особый интерес их применение в терапевтических целях. В связи с этим актуальной является задача изучения токсичности производных витамина В12.

Онкопротекторные эффекты производных витамина В12 в цитологических экспериментах практически не изучены. Поэтому в настоящем исследовании мы провели хемореактомный скрининг эффектов аквакабаламина и ГЭЦАКК на 470 культурах опухолевых клеток человека. Затем мы провели экспериментальное изучение цитотоксических эффектов аквакабаламина и его производного ГЭЦАКК на клетки карциномы легких А549, проточного рака молочных желез BT-474 и иммортализованных фибробластов Фб-hTERT, которые подтверждают результаты хемореактомного скрининга.

Цель – проведение хемореактомного скрининга *in silico* и экспериментального исследования цитотоксической активности *in vitro* аквакабаламина и ГЭЦАКК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

Хемореактомный скрининг / Chemoreactome screening

Хемореактомный скрининг молекул аквакабаламина и ГЭЦАКК проведен в соответствии с методологией, описанной подробно в предыдущих работах [11, 21–23]. На основе проблемно-ориентированной теории анализа изоморфизма хемографов, которая является расширением алгебраического подхода к задачам машинного обучения и распознаванию, были получены обучаемые алгоритмы вычисления химических расстояний между произвольными молекулами. В качестве базы данных для формирования «обучающих» и «тестовых» выборок молекул использован ресурс Sanger Institute (США), сформированный на основании геномных исследований чувствительности различных линий опухолевых клеток в культуре к лекарствам (в нем представлен полный список 470 типов клеток) [24].

Первым шагом собственно скрининга является установление списка молекул из базы данных молекул с известными свойствами, которые наиболее близки по структуре к

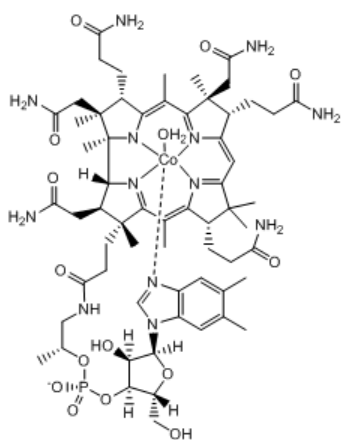
оцениваемой молекуле (т.е. вычисление $d\chi$). Второй шаг – извлечение из базы данных экспериментальной информации о молекулах, схожих с заданной. Третий шаг – оценка биологических активностей исследуемой молекулы (в т.ч. моделирование взаимодействия с протеомом), т.е. собственно хемореактомный анализ, заключающийся в вычислении эмпирических функций распределения оцениваемой величины (выживаемости клеток).

Представленные далее оценки значений биологических констант полуингибирования (IC_{50}) получены как математическое ожидание и дисперсия соответствующих эмпирических функций распределений [11]. На каждом этапе анализа проводили оценку переобучения получаемых алгоритмов посредством сравнения аккуратности оценок на «обучающих» и «тестовых» выборках данных.

Синтез гидрофобного производного витамина B12 / Synthesis of vitamin B12 hydrophobic derivative

В работе изучались аквакобаламин (рис. 1, а) и гидрофобное производное витамина B12 гептаметилловый эфир дицианокобириновой кислоты (рис. 1, б). Гептаметилловый эфир дицианокобириновой кислоты $((CN)_2C_{by}(OCH_3)_7)$ получали кипячением раствора витамина B12 метанол / серная кислота (1,0 М) в течение 4 сут. ГЭЦАКК $((CN)(H_2O)C_{by}(OCH_3)_7)$ получали путем вакуумной сушки водного раствора $(CN)_2C_{by}(OCH_3)_7$ (рН 4,0 и 25 °С). Строение и чистота эфира подтверждены данными ядерного магнитного резонанса (ЯМР) 1H , элементным анализом, масс-спектроскопией MALDI-ToF (англ. matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight).

а



б

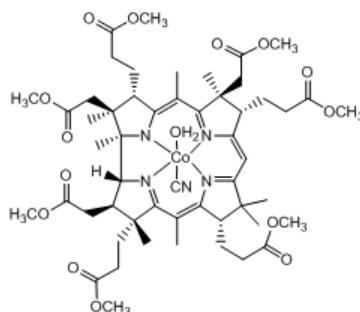


Рисунок 1. Структуры аквакобаламина (а) и гептаметиллового эфира цианоаквакобириновой кислоты (синтез Д.С. Сальникова) (б)

Figure 1. Structures of aquacobalamin (a) and heptamethyl ester of cyanoaquacobiric acid (synthesis by D.S. Salnikov) (b)

Исследования цитотоксичности / Cytotoxicity studies

Исследования цитотоксичности выполняли для двух производных витамина В12 (аквакобаламин и гидрофобное производное ГЭЦАКК) на культурах нормальных и опухолевых клеток: клеточные линии иммортализованных (теломеризованных) фибробластов (Фб-hTERT), карциномы легкого (A549), рака протока молочной железы (BT-474). Клеточные линии A549 и Фб-hTERT культивировали в питательной среде DMEM (англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл и L-глутамин 292 мкг/мл в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С. Клеточную линию BT-474 культивировали в питательной среде RPMI (англ. Roswell Park Memorial Institute medium), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл и L-глутамин 292 мкг/мл в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С. Пересев всех клеточных линий проводили каждые 3–4 сут.

Для открепления клеток от субстрата из культурального флакона удаляли питательную среду и промывали клетки 1 мл 0,02% раствора Версена, затем добавляли 2 мл 0,02% раствора Версена и инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре, добавляли 630–660 мкл 0,25% раствора трипсина и инкубировали при 37 °С в течение 3 мин (в случае клеточных линий A549 и Фб-hTERT). В случае клеточной линии BT-474 добавляли только раствор Версена и инкубировали 40 мин при 37 °С. Убедившись, что клетки готовы открепиться, их переносили из монослоя в суспензию в полной питательной среде, осуществляли подсчет клеток с использованием камеры Горяева.

Для проведения МТТ-теста в лунки 96-луночных микротитрационных планшетов вносили 5000 клеток в 100 мкл культуральной среды. Лунка А1 использовалась в качестве бланка, в нее помещали 100 мкл культуральной среды без содержания клеток. Затем клетки культивировали в CO₂ инкубаторе в стандартных условиях в течение 24 ч для адгезии клеток к субстрату.

Методом разведения с добавлением полной питательной среды готовили серию разведений исходного препарата так, чтобы получить растворы с последовательно снижающейся в 2 раза концентрацией исследуемых веществ. Полученные растворы добавляли в лунки, содержащие культуру клеток в объеме 100 мкл. В контрольные лунки

вносили 100 мкл полной питательной среды. После внесения исследуемых веществ клетки культивировали в CO₂ инкубаторе в стандартных условиях в течение 72 ч.

Реактив МТТ растворяли в деионизированной воде (5 мг/мл) и вносили по 20 мкл полученного раствора в каждую лунку планшета и инкубировали в CO₂ инкубаторе в стандартных условиях в течение 4 ч.

По истечении времени инкубации культуральную среду с исследуемым препаратом с осторожностью, стараясь не задевать клетки, удаляли аспирацией с помощью автоматического дозатора и в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл диметилсульфоксида, инкубировали 5–10 мин. Появившееся фиолетовое окрашивание детектировали на планшетном ридере при 492 нм (референтная длина волны 630 нм).

Статистический анализ / Statistical analysis

Статистический анализ результатов исследований клеточных культур *in vitro* проводили с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft, США), Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США), OriginPro-8 (OriginLab Corp., США). Рассчитывали процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке относительно лунок положительного контроля, жизнеспособность которых принимали за 100%. Далее строили графики зависимости жизнеспособности клеток, выражаемые в процентах относительно десятичного логарифма концентраций добавленного препарата. Полученную кривую подвергали анализу Non-linear curve fit – Logistic в программном обеспечении OriginPro-8 и рассчитывали концентрацию, при которой наблюдалось полумаксимальное ингибирование роста клеток (IC₅₀) сначала в исходных единицах измерения концентраций (мкг/л), затем в нмоль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Хемореактомный скрининг / Chemoreactome screening

Хемореактомный скрининг эффектов молекул на опухолевые клетки позволил получить оценки IC₅₀ роста клеток для 470 линий опухолевых клеток. В зависимости от клеточной линии и молекулы производного витамина B12 значения IC₅₀ изменялись в достаточно широком диапазоне – от 15 до 2000 нМ (**рис. 2, а**). Напомним, что более низкие значения IC₅₀ для данного вещества по сравнению с другими веществами соответствуют его более выраженной противоопухолевой активности для заданной линии клеток. Полный список клеточных линий представлен на ресурсе ChEMBL [24].

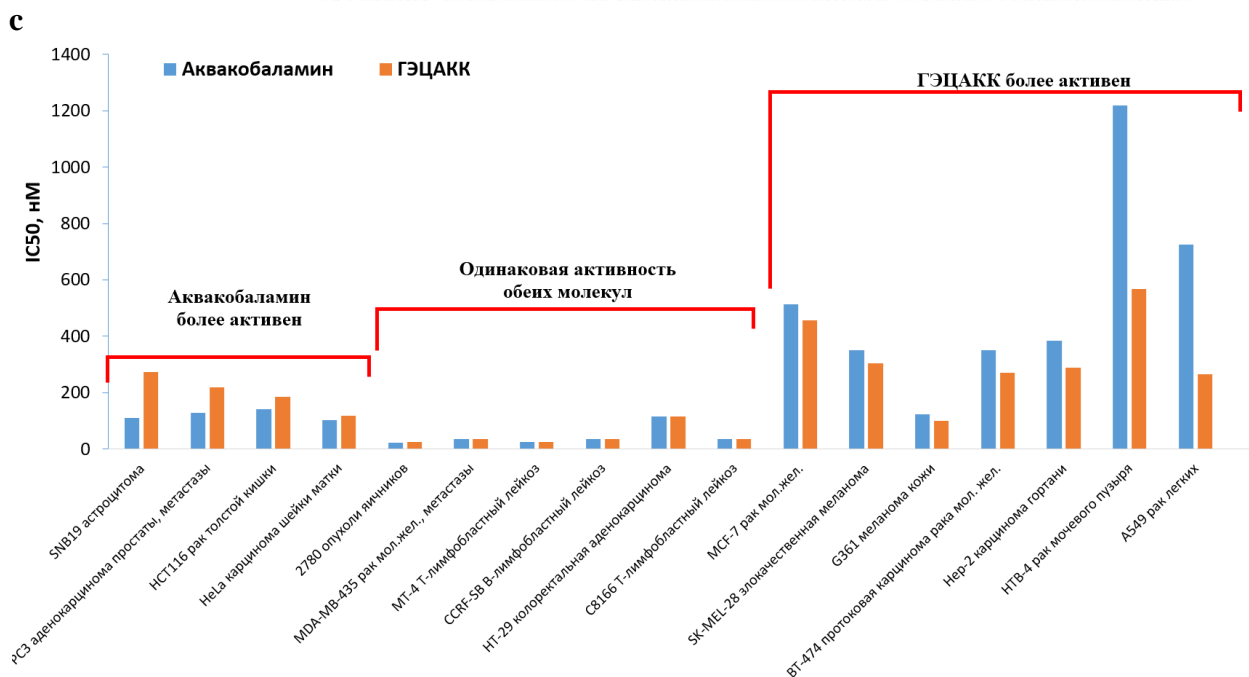
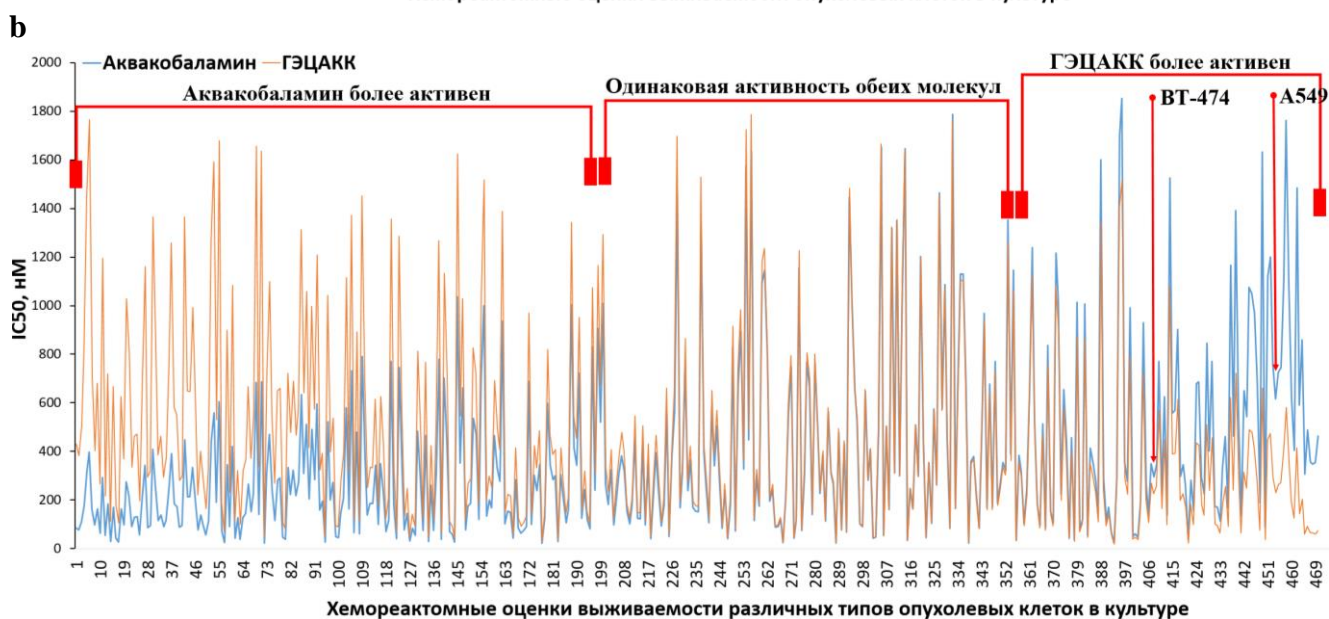
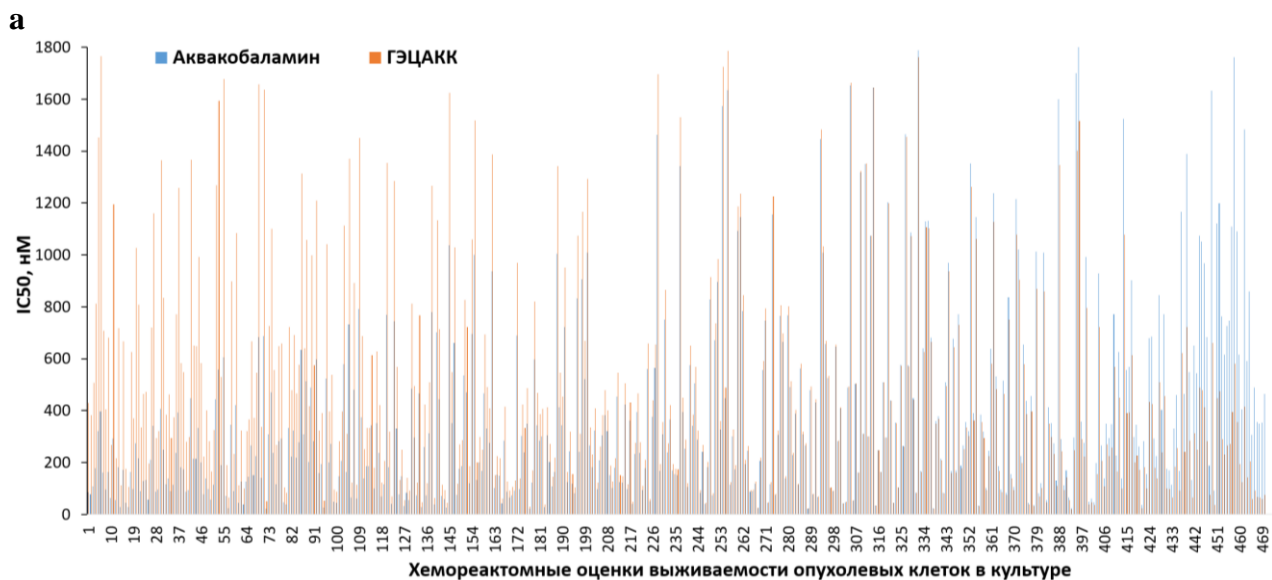


Рисунок 2. Результаты хемореактомного скрининга эффектов аквакобаламина и гептаметилового эфира цианаквакобириновой кислоты (ГЭЦАКК). Данные упорядочены по возрастанию отношения значения константы полуингибирования (IC50) для аквакобаламина к значению IC50 для ГЭЦАКК:

a – оценки IC50; **b** – группировка линий клеток по сравнительным эффектам двух молекул, показано расположение результатов, соответствующих клеточным линиям A549 и BT-474, экспериментально исследованным в настоящей работе; **c** – примеры IC50, полученных в результате проведения хемореактомного скрининга, для отдельных линий опухолевых клеток

Figure 2. Results of chemoreactom screening of the effects of aquacobalamin and heptamethyl ester of cyanaquacobyric acid (HECCA). Data are sorted in ascending order of ratio of half-maximal inhibitory concentration (IC50) for aquacobalamin to IC50 for HECCA:

a – IC50 scores; **b** – grouping of cell lines according to the comparative effects of two molecules; the location of the results corresponding to A549 and BT-474 cell lines experimentally studied in this work is shown; **c** – examples of IC50s obtained from chemoreactom screening for selected tumor cell lines

Очевидно, что исследованные молекулы по-разному воздействовали на различные линии опухолевых клеток. Приблизительно для 190 клеточных линий аквакобаламин был достоверно более активен, чем ГЭЦАКК (**рис. 2, b**). Для 160 линий клеток активности обеих молекул были практически одинаковы, а для 120 линий клеток противоопухолевая активность ГЭЦАКК была достоверно выше, чем для аквакобаламина. При этом клеточные линии A549, BT-474, экспериментально исследованные в настоящей работе, относились именно к последней категории (ГЭЦАКК более активен, чем аквакобаламин).

Анализ значений IC50, полученных в результате проведения хемореактомного скрининга для отдельных клеточных линий (**рис. 2, c**) показывает, что аквакобаламин был более эффективен для клеточных линий SNB19 (астроцитомы), PC3 (метастатическая аденокарцинома простаты), HCT116 (рак толстой кишки), HeLa (карцинома шейки матки). Активность обеих молекул была практически одинаковой для лейкозов – MT-4 (Т-лимфобластный лейкоз), CCRF-SB (В-лимфобластный лейкоз), C8166 (Т-лимфобластный лейкоз), а также линий клеток HT-29 (колоректальная аденокарцинома), 2780 (опухоль яичников) и MDA-MB-435 (метастатический рак молочной железы). Активность ГЭЦАКК была выше для клеток неметастатического рака молочной железы – MCF-7 (рак молочной железы), BT-474 (карцинома протока молочной железы); эпителиальных патологий – SK-

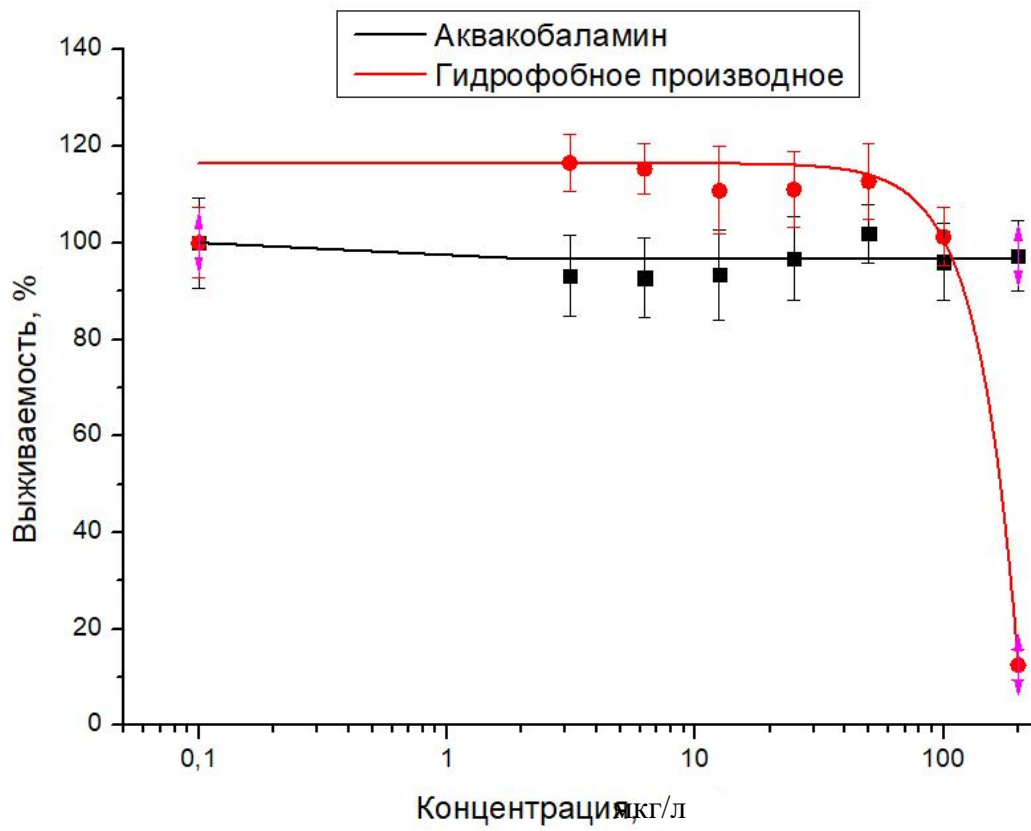
MEL-28 (злокачественная меланома), G361 (меланома кожи); линий НТВ-4 (рак мочевого пузыря), A498 (рак почки), Нер-2 (карцинома гортани), A549 (рак легких).

Для клеточных линий ВТ-474 и А549, которые были экспериментально исследованы в рамках настоящей работы, значения IC50 для обеих молекул, полученные в результате хемореактомного скрининга, существенно отличались. В случае линии ВТ-474 (карцинома протока молочной железы) значение IC50 для аквакобаламина было в 1,3 раза выше, чем для ГЭЦАКК (350,2 и 270,4 нМ соответственно), а для линии А549 (рак легких) – в 2,7 раза выше (725.6 и 265.2 нМ соответственно).

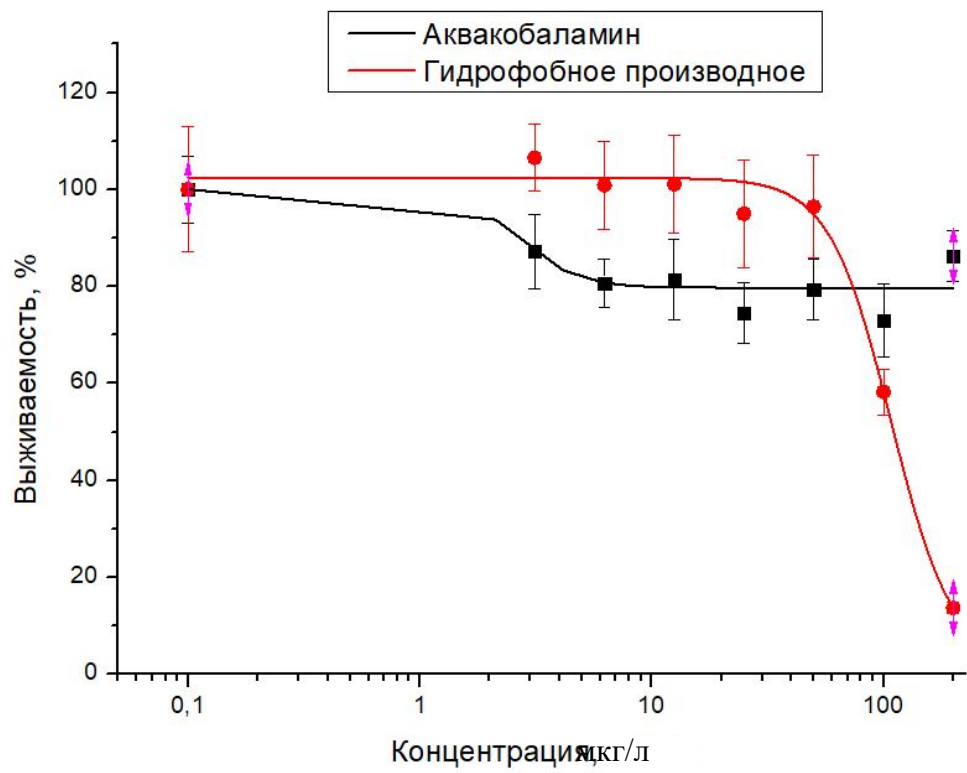
Исследования цитотоксичности / Cytotoxicity studies

При экспериментальном исследовании влияния производных витамина В12 на выживаемость клеточных культур были получены схожие результаты для клеточных линий А549 (аденокарциномные альвеолярные базальные эпителиальные клетки от пациента с раком легких) (**рис. 3, а**) и ВТ-474 (карцинома молочной железы человека, протоковая линия) (**рис. 3, б**). На клеточной линии рака протока молочной железы (ВТ-474) были заметны колебания в выживаемости клеток – до 73% при концентрации 100 мкг/л. Анализ графиков выживаемости обеих линий клеток в культуре позволил получить экспериментальные значения IC50 для ГЭЦАКК: 107,2 мкг/л (100,8 нМ) для А549 и 108,6 мкг/л (102,2 нМ) для ВТ-474. Значения IC50 для аквакобаламина были существенно выше, чем 200 мкг/мл (188 нМ).

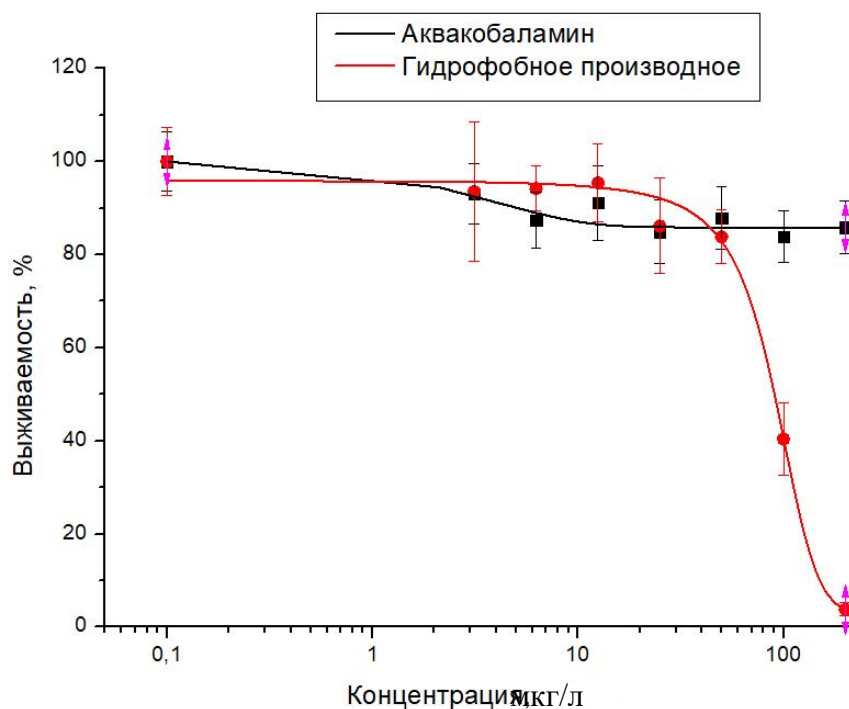
Для сравнения использованы теломеризованные фибробласты кожи человека (Фб-hTERT), анализ кривой выживаемости которых (**рис. 3, с**) показал низкую цитотоксичность аквакобаламина (IC50 >> 200 нМ) и цитотоксичность ГЭЦАКК, сопоставимую с воздействием на опухолевые клетки (IC50 90,4 мкг/л; 85,2 нМ).



a



b



с

Рисунок 3. Сравнительные графики выживаемости опухолевых клеток в зависимости от концентраций гидрофобного производного и аквакобаламина:

а – линия А549 (аденокарциномные альвеолярные базальные эпителиальные клетки от пациента с раком легких); б – ВТ-474 (карцинома молочной железы человека, протоковая клеточная линия); с – Фб-hTERT (теломеризованные фибробласты кожи человека)

Figure 3. Comparative graphs of tumor cell survival depending on the concentrations of the hydrophobic derivative and aquacobalamin:

а – line А549 (adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells from a patient with lung cancer); б – ВТ-474 (human breast carcinoma, ductal cell line); с – Phb-hTERT (telomerized human skin fibroblasts)

Таким образом, экспериментальные результаты для клеток линий ВТ-474 и А549 подтверждают данные хемореактомного скрининга. Во-первых, в обоих случаях значения IC50 для ГЭЦАКК были существенно ниже, чем для аквакобаламина. Во-вторых, коэффициент пересчета с хемореактомных оценок на экспериментальные (т.е. расчет отношения значений IC50, полученных в двух видах исследования) был весьма близок для обеих линий клеток и составил 2,64 для ВТ-474 и 2,63 для А549. Поэтому результаты хемореактомного скрининга для других опухолевых линий клеток (см. рис. 2) могут быть использованы для планирования последующих клеточных экспериментов с производными витамина В12.

ОБСУЖДЕНИЕ / DISCUSSION

Для оценки цитотоксических эффектов веществ важно определить их воздействия не только на опухолевые, но и на неопухолевые, нормальные клетки. В качестве таковых в настоящем исследовании были использованы теломеризованные фибробласты кожи человека (Фб-hTERT). Анализ кривой выживаемости которых (см. рис. 3, с) показал низкую цитотоксичность аквакобаламина и цитотоксичность ГЭЦАКК, сопоставимую с воздействием на опухолевые клетки.

Для более адекватного восприятия последнего результата следует отметить, что клетки линии Фб-hTERT являются не вполне «нормальными» фибробластами кожи – скорее, они близки к фенотипу фибробластов, образующихся при патологических келоидных рубцах (для которых характерна высокая активность теломеразы). Такие келоидные фибробласты весьма схожи с иммортализованными клетками, что определяет перспективность использования Фб-hTERT в качестве модельных клеток при разработке клеточных моделей гиперпластических (келоидных и гипертрофических) рубцов [25].

Преимуществами клеток линии Фб-hTERT, делающими их весьма удобными для экспериментальной работы, являются:

- устойчивый фенотип, воспроизводимый до 200-го пассажа;
- способность к неограниченному числу делений;
- фенотипическая однородность клеток различных пассажей;
- способность образовывать клеточные сфероиды.

Однако сравнительное исследование культур нормальных фибробластов кожи (НФ, первичные клеточные линии фибробластов третьего пассажа) и теломеризованных фибробластов Фб-hTERT показало существенные отличия в фенотипе и метаболических свойствах этих клеток [26]. Нормальные и иммортализованные фибробласты кожи различались размерами и пролиферативной активностью. НФ по сравнению с Фб-hTERT быстрее восстанавливали дефект монослоя в интактном состоянии (т.е. более быстро регенерировали), а клетки Фб-hTERT, напротив, регенерировали гораздо медленнее, даже при стимуляции ростовым фактором TGF β 1 (вследствие сниженной способности к уплотнению за счет более слабых межклеточных контактов). Фб-hTERT характеризовались и более высокой по сравнению с НФ метаболической активностью клеток в покое и при воздействии TGF β 1 (данные МТТ-теста). Продукция основных фибробласт-специфических белков, используемых для формирования структур волокнистой соединительной ткани (коллаген I и III типов, фибронектин), была снижена в Фб-hTERT по сравнению с НФ (причем даже на фоне стимуляции TGF β 1) [18].

Результаты сравнительного исследования позволяют утверждать, что клетки Фб-hTERT менее жизнестойки, чем нормальные фибробласты человека, что отчасти объясняет полученные выше результаты анализа цитотоксичности ГЭЦАКК.

Благодарность / Acknowledgement

Благодарим проф. Е.Е. Егорова (ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук) за любезно предоставленные клеточные линии А549 (карцинома легкого человека) и линии Фб-hTERT (теломеризированные, т.е. иммортализованные фибробласты кожи человека). Культура была получена в результате введения гена каталитического компонента теломеразы в фибробласты кожи линии 1608 [25]. Также выражаем благодарность Е.И. Шрамовой (ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук) за любезно предоставленную клеточную линию ВТ-474.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

В настоящем исследовании представлены результаты хемореактомного *in silico* скрининга эффектов воздействия аквакобаламина и ГЭЦАКК на 470 культур опухолевых клеток человека, в т.ч. клетки карциномы протока молочной железы (линия ВТ-474) и клетки карциномы легкого (линия А549). Экспериментально проанализированы цитотоксические свойства аквакобаламина и его гидрофобного производного в концентрациях от 3,125 мкг/л до 200 мкг/л на линиях клеток ВТ-474 и А549.

Из полученных экспериментальных данных видно, что в рассматриваемых концентрациях аквакобаламин не обладает явно выраженным цитотоксическим эффектом для клеточных линий ВТ-474 и А549 ($IC_{50} \gg 200$ нМ). На обеих линиях клеток гидрофобное производное ГЭЦАКК показало цитотоксические свойства при высоких концентрациях (IC_{50} порядка 100 нМ). На нормальной клеточной линии фибробластов Фб-hTERT в указанных концентрациях также было отмечено цитотоксическое действие обоих веществ. Показано соответствие между результатами хемореактомного скрининга *in silico* и данными исследований *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Торшин И.Ю., Громова О.А., Майорова Л.А. О перспективах применения производных витамина В12 в фармакологии. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2023; 16 (3): 501–11. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2023.198>.
2. Wu K., Helzlsouer K.J., Comstock G.W., et al. A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8 (3): 209–17.
3. Hernandez B.Y., McDuffie K., Wilkens L.R., et al. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. *Cancer Causes Control*. 2003; 14 (9): 859–70. <https://doi.org/10.1023/b:caco.0000003841.54413.98>.
4. Nakagawa K., Kudoh S., Matsui K., et al. A phase I study of pemetrexed (LY231514) supplemented with folate and vitamin B12 in Japanese patients with solid tumours. *Br J Cancer*. 2006; 95 (6): 677–82. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603321>.
5. Громова О.А., Торшин И.Ю., Стаховская Л.В., Федотова Л.Э. Хемореактомный анализ молекул тиамин дисульфида, тиамин гидрохлорида и бенфотиамина. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2017; 9 (2): 50–7. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2017-2-50-57>.
6. Громова О.А., Торшин И.Ю., Фролова Д.Е., Филимонова М.В. Противоопухолевые эффекты сочетанного применения витаминов В1, В6 и В12. *Неврология и ревматология (Приложение к журналу Consilium Medicum)*. 2018; 1: 62–6. https://doi.org/10.26442/2414-357X_2018.1.62-66.
7. Громова О.А., Торшин И.Ю., Филимонова М.В., Сорокина М.А. Роль витаминов в профилактике рака и их влияние на эффективность противоопухолевой терапии: систематический анализ доказательных исследований. *Терапия*. 2018; 2 (20): 108–20.
8. Sun N.H., Huang X.Z., Wang S.B., et al. A dose-response meta-analysis reveals an association between vitamin B12 and colorectal cancer risk. *Public Health Nutr*. 2016; 19 (8): 1446–56. <https://doi.org/10.1017/S136898001500261X>.
9. Громова О.А., Стаховская Л.В., Торшин И.Ю. и др. О потенциальном противоопухолевом эффекте витамина В12. *Российский журнал боли*. 2017; 2: 62–73.
10. Stoffregen C.C., Odin E.A., Carlsson G.U., et al. Reduced folate and serum vitamin metabolites in patients with rectal carcinoma: an open-label feasibility study of pemetrexed with folic acid and vitamin B12 supplementation. *Anticancer Drugs*. 2016; 27 (5): 439–46. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000345>.

11. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Maiorova L.A., et al. Bioinformatic and chemoneurocytological analysis of the pharmacological properties of vitamin B12 and some of its derivatives. *J Porphyrins Phthalocyanines*. 2021; 25 (09): 835–42. <https://doi.org/10.1142/S1088424621500644>.
12. Gromova O.A., Maiorova L.A., Salnikov D.S., et al. Vitamin B12 hydrophobic derivative exhibits bioactivity: biomedical and photophysical study. *BioNanoSci*. 2022; 12: 74–82. <https://doi.org/10.1007/s12668-021-00916-4>.
13. Valkova L.A., Glibin A.S., Valli L. Quantitative analysis of compression isotherms of fullerene C60 Langmuir layers. *Colloid J*. 2008; 70: 6–11. <https://doi.org/10.1134/S1061933X0801002X>.
14. Valkova L.A., Glibin A.S., Koifman O.I. Influence of the solvent nature on the structure of two-dimensional nanoaggregates in Langmuir layers of copper tetra-tert-butyltetrabenzotriazaporphyrin. *Macroheterocycles*. 2011; 4 (3): 222–6.
15. Valkova L.A., Erokhin V.V., Glibin A.S., Koifman O.I. The influence of molecular structure and π -system extent on nano- and microstructure of Langmuir layers of copper azaporphyrins. *J Porphyr Phthalocyanines*. 2011; 15: 1044–51. <https://doi.org/10.1142/S1088424611004026>.
16. Valkova L.A., Shabyshev L.S., Feigin L.A., Akopova O.B. Formation and X-ray diffraction investigation of Langmuir–Blodgett films of liquid crystalline substituted crown esters. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 1996; 6 (4): 291–8.
17. Valkova L., Borovkov N., Maccioni E., et al. Influence of molecular and supramolecular factors on sensor properties of Langmuir–Blodgett films of tert-butyl-substituted copper azaporphyrines towards hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2002; 198: 891–6. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01016-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01016-0).
18. Karlyuk M.V., Krygin Yu.Yu., Maiorova-Valkova L.A., et al. Formation of two-dimensional (M) and three-dimensional (V) nanoaggregates of substituted cobalt porphyrin in the Langmuir layers and Langmuir–Schaefer films. *Russian Chemical Bulletin*. 2013; 62: 471–9. <https://doi.org/10.1007/s11172-013-0066-5>.
19. Valkova L.A., Betrencourt C., Hochapfel A., et al. Monolayer study of monensin and lasalocid in the gas state. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 1996; 287 (1): 269–73. <https://doi.org/10.1080/10587259608038763>.
20. Maiorova L.A., Kobayashi N., Salnikov D.S., et al. Supermolecular nanoentities of vitamin B12 derivative as a link in the evolution of the parent molecules during self-assembly at

the air-water interface. *Langmuir*. 2023; 39 (9): 3246–54. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02964>.

21. Торшин И.Ю. О задачах оптимизации, возникающих при применении топологического анализа данных к поиску алгоритмов прогнозирования с фиксированными корректорами. *Информатика и ее применения*. 2023; 17 (2): 2–10. <https://doi.org/10.14357/19922264230201>.

22. Торшин И.Ю. О применении топологического подхода к анализу плохо формализуемых задач для построения алгоритмов виртуального скрининга квантово-механических свойств органических молекул. I: Основы проблемно ориентированной теории. *Информатика и ее применения*. 2022; 16 (1): 39–45. <https://doi.org/10.14357/19922264220106>.

23. Торшин И.Ю. О применении топологического подхода к анализу плохо формализуемых задач для построения алгоритмов виртуального скрининга квантово-механических свойств органических молекул. II: Сопоставление формализма с конструктами квантовой механики и экспериментальная апробация предложенных алгоритмов. *Информатика и ее применения*. 2022; 16 (2): 35–43. <https://doi.org/10.14357/19922264220205>.

24. ChEMBL. Genomics of drug sensitivity in cancer screening data. URL: <http://www.doi.org/10.6019/CHEMBL1201861> (дата обращения 15.08.2023).

25. Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова К. и др. Теломеризация как метод получения бессмертных клеток человека, сохраняющих нормальные свойства. *Ontogenez*. 2003; 34 (3): 183–92.

27. Шадрин В.С., Кожин П.М., Шошина О.О. и др. Теломеризованные фибробласты как потенциальный объект для 3D-моделирования патологических гипертрофических рубцов in vitro. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2020; 5: 82–90. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.057>.

REFERENCES:

1. Torshin I.Yu., Gromova O.A., Maiorova L.A. The prospects for the use of vitamin B12 derivatives in pharmacology. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2023; 16 (3): 501–11 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2023.198>.

2. Wu K., Helzlsouer K.J., Comstock G.W., et al. A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8 (3): 209–17.
3. Hernandez B.Y., McDuffie K., Wilkens L.R., et al. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. *Cancer Causes Control.* 2003; 14 (9): 859–70. <https://doi.org/10.1023/b:caco.0000003841.54413.98>.
4. Nakagawa K., Kudoh S., Matsui K., et al. A phase I study of pemetrexed (LY231514) supplemented with folate and vitamin B12 in Japanese patients with solid tumours. *Br J Cancer.* 2006; 95 (6): 677–82. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603321>.
5. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Stakhovskaya L.V., Fedotova L.E. Chemoreactomic analysis of thiamine disulfide, thiamine hydrochloride, and benfotiamine molecules. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2017; 9 (2): 50–7 (in Russ.). <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2017-2-50-57>.
6. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Frolova D.E., Filimonova M.V. Antitumor effects of the combined use of vitamins B1, B6 and B12. *Neurology and Rheumatology (Suppl. Consilium Medicum).* 2018; 1: 62–6. https://doi.org/10.26442/2414-357X_2018.1.62-66.
7. Gromova O.A., Torshin I.Ju., Filimonova M.V., Sorokina M.A. The role of vitamins in cancer prevention and their influence at anticancer treatment efficacy: systematic analysis of evidentiary research works. *Therapy.* 2018; 2 (20): 108–20 (in Russ.).
8. Sun N.H., Huang X.Z., Wang S.B., et al. A dose-response meta-analysis reveals an association between vitamin B12 and colorectal cancer risk. *Public Health Nutr.* 2016; 19 (8): 1446–56. <https://doi.org/10.1017/S136898001500261X>.
9. Gromova O.A., Stakhovskaya L.V., Torshin I.Yu. et al. On the potential antitumor effect of vitamin B12. *Russian Journal of Pain.* 2017; 2: 62–73 (in Russ.).
10. Stoffregen C.C., Odin E.A., Carlsson G.U., et al. Reduced folate and serum vitamin metabolites in patients with rectal carcinoma: an open-label feasibility study of pemetrexed with folic acid and vitamin B12 supplementation. *Anticancer Drugs.* 2016; 27 (5): 439–46. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000345>.
11. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Maiorova L.A., et al. Bioinformatic and chemoneurocytological analysis of the pharmacological properties of vitamin B12 and some of its derivatives. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2021; 25 (09): 835–42. <https://doi.org/10.1142/S1088424621500644>.

12. Gromova O.A., Maiorova L.A., Salnikov D.S., et al. Vitamin B12 hydrophobic derivative exhibits bioactivity: biomedical and photophysical study. *BioNanoSci.* 2022; 12: 74–82. <https://doi.org/10.1007/s12668-021-00916-4>.
13. Valkova L.A., Glibin A.S., Valli L. Quantitative analysis of compression isotherms of fullerene C60 Langmuir layers. *Colloid J.* 2008; 70: 6–11. <https://doi.org/10.1134/S1061933X0801002X>.
14. Valkova L.A., Glibin A.S., Koifman O.I. Influence of the solvent nature on the structure of two-dimensional nanoaggregates in Langmuir layers of copper tetra-tert-butyltetrabenzotriazaporphyrin. *Macroheterocycles.* 2011; 4 (3): 222–6.
15. Valkova L.A., Erokhin V.V., Glibin A.S., Koifman O.I. The influence of molecular structure and π -system extent on nano- and microstructure of Langmuir layers of copper azaporphyrins. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2011; 15: 1044–51. <https://doi.org/10.1142/S1088424611004026>.
16. Valkova L.A., Shabyshev L.S., Feigin L.A., Akopova O.B. Formation and X-ray diffraction investigation of Langmuir–Blodgett films of liquid crystalline substituted crown esters. *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 1996; 6 (4): 291–8.
17. Valkova L., Borovkov N., Maccioni E., et al. Influence of molecular and supramolecular factors on sensor properties of Langmuir–Blodgett films of tert-butyl-substituted copper azaporphyrines towards hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2002; 198: 891–6. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01016-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01016-0).
18. Karlyuk M.V., Krygin Yu.Yu., Maiorova-Valkova L.A., et al. Formation of two-dimensional (M) and three-dimensional (V) nanoaggregates of substituted cobalt porphyrin in the Langmuir layers and Langmuir–Schaefer films. *Russian Chemical Bulletin.* 2013; 62: 471–9. <https://doi.org/10.1007/s11172-013-0066-5>.
19. Valkova L.A., Betrencourt C., Hochapfel A., et al. Monolayer study of monensin and lasalocid in the gas state. *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 1996; 287 (1): 269–73. <https://doi.org/10.1080/10587259608038763>.
20. Maiorova L.A., Kobayashi N., Salnikov D.S., et al. Supermolecular nanoentities of vitamin B12 derivative as a link in the evolution of the parent molecules during self-assembly at the air-water interface. *Langmuir.* 2023; 39 (9): 3246–54. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02964>.
21. Torshin I.Yu. On optimization problems arising from the application of topological data analysis to the search for forecasting algorithms with fixed correctors. *Informatika i ee*

primeneniya / Informatics and applications. 2023; 17 (2): 2–10 (in Russ.).
<https://doi.org/10.14357/19922264230201>.

22. Torshin I.Yu. On the application of a topological approach to the analysis of poorly formalized problems for constructing algorithms for virtual screening of quantum mechanical properties of organic molecules. I: The basics of the problem-oriented theory. *Informatika i ee primeneniya / Informatics and applications.* 2022; 16 (1): 39–45 (in Russ.).
<https://doi.org/10.14357/19922264220106>.

23. Torshin I.Yu. On the application of the topological approach to analysis of poorly formalized problems for constructing algorithms for virtual screening of quantum mechanical properties of organic molecules. II: Comparison of formalism with constructions of quantum mechanics and experimental approbation of the proposed algorithms. *Informatika i ee primeneniya / Informatics and applications.* 2022; 16 (2): 35–43 (in Russ.).
<https://doi.org/10.14357/19922264220205>.

24. [ChEMBL. Genomics of drug sensitivity in cancer screening data. Available at:
<http://www.doi.org/10.6019/CHEMBL1201861> (accessed 15.08.2023).

25. Egorov E.E., Terekhov S.M., Vishniakova K., et al. Telomerization as a method of obtaining immortal human cells preserving normal properties. *Ontogenez.* 2003; 34 (3): 183–92 (in Russ.).

27. Shadrin V.S., Kozhin P.M., Shoshina O.O., et al. Telomerized fibroblasts as a candidate 3D in vitro model of pathological hypertrophic scars. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2020; 5: 82–90 (in Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.057>.

=====

Сведения об авторах

Торшин Иван Юрьевич – к.ф.-м.н., к.х.н., старший научный сотрудник ФИЦ «Информатика и управление» РАН (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>; WoS ResearcherID: C-7683-2018; Scopus Author ID: 7003300274; РИНЦ SPIN-код: 1375-1114.

Филимонова Марина Владимировна – д.м.н., д.б.н., заведующая лабораторией радиационной фармакологии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Обнинск, Россия).

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФИЦ «Информатика и управление» РАН (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; WoS ResearcherID: J-4946-2017; Scopus Author ID: 7003589812; РИНЦ SPIN-код: 6317-9833. E-mail: unesco.gromova@gmail.com.

Майорова Лариса Александровна – д.ф.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФИЦ «Информатика и управление» РАН (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3172-5621>; WoS ResearcherID: B-6288-2016; Scopus Author ID: 6701491872; РИНЦ SPIN-код: 7190-2147.

Сорокина Мария Андреевна – аналитик Нейрокампуса-2030 ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1541-9480>; Scopus Author ID: 57226747037; РИНЦ SPIN-код: 4142-8679.

Фролова Дарья Евгеньевна – ассистент кафедры онкологии, акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России (Иваново, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1912-4607>; РИНЦ SPIN-код: 6668-6245.

Громов Андрей Николаевич – инженер-исследователь ФИЦ «Информатика и управление» РАН (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7507-191X>; WoS ResearcherID: C-7476-2018; Scopus Author ID: 7102053964; РИНЦ SPIN-код: 8034-7910 910.

Рейер Иван Александрович – к.т.н., научный сотрудник ФИЦ «Информатика и управление» РАН (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; Scopus Author ID: 14042533700.

About the authors

Ivan Yu. Torshin – PhD (Phys. Math.), PhD (Chem.), Senior Researcher, Federal Research Center “Computer Science and Control”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-7998>; WoS ResearcherID: C-7683-2018; Scopus Author ID: 7003300274; RSCI SPIN-code: 1375-1114.

Marina V. Filimonova – Dr. Med. Sc., Dr. Biol. Sc., Head of Laboratory of Radiation Pharmacology, Tsyba Medical Radiological Research Center – branch of Scientific Medical Research Center of Radiology (Obninsk, Russia).

Olga A. Gromova – Dr. Med. Sc., Professor, Leading Researcher, Federal Research Center “Computer Science and Control”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000->

[0002-7663-710X](#); WoS ResearcherID: J-4946-2017; Scopus Author ID: 7003589812; RSCI SPIN-code: 6317-9833. E-mail: unesco.gromova@gmail.com.

Larissa A. Maiorova – Dr. Phys. Math. Sc., Professor, Leading Researcher, Federal Research Center “Computer Science and Control”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3172-5621>; WoS ResearcherID: B-6288-2016; Scopus Author ID: 6701491872; RSCI SPIN-code: 7190-2147.

Maria A. Sorokina – Analyst, Neurocampus-2030, Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1541-9480>; Scopus Author ID: 57226747037; RSCI SPIN-code: 4142-8679.

Darya E. Frolova – Assistant Professor, Chair of Oncology, Obstetrics and Gynecology, Ivanovo State Medical Academy (Ivanovo, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1912-4607>; RSCI SPIN-code: 6668-6245.

Andrey N. Gromov – Research Engineer, Federal Research Center “Computer Science and Control”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7507-191X>; WoS ResearcherID: C-7476-2018; Scopus Author ID: 7102053964; RSCI SPIN-code: 8034-7910 910.

Ivan A. Reyer – PhD (Tech.), Researcher, Federal Research Center “Computer Science and Control”, RAS (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-710X>; Scopus Author ID: 14042533700.