

Противоопухолевые эффекты витамина B12 *in vitro*, *in vivo*, *in silico*

О.А. Громова¹, Д.Е. Фролова², И.Ю. Торшин¹, М.В. Филимонова³, М.А. Сорокина⁴, И.А. Рейер¹, О.А. Лиманова², Л.Э. Федотова², Л.А. Майорова^{1,5}

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

² *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Шереметевский пр-т, д. 8, Иваново 153012, Россия)*

³ *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)*

⁴ *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)*

⁵ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановский государственный химико-технологический университет» (Шереметевский пр-т, д. 7, Иваново 153012, Россия)*

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

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.

РЕЗЮМЕ

Цель: исследовать противоопухолевые эффекты различных форм витамина В12 в сочетании с различными витаминами-синергистами и оценить перспективы клинических применений.

Материал и методы. В качестве клеточной модели *in vitro* использовались клетки линий ВТ-474 (карцинома протока молочной железы) и А549 (карцинома легкого), а в качестве опухолевой модели у животных *in vivo* – перевиваемая эпидермоидная карцинома легких Льюис (КЛЛ). Исследования КЛЛ на животных проведены на 25 самцах мышей-гибридов F₁ (возраст 2,5–3 мес, масса тела 23–26 г). Исследование *in silico* выполнено как систематический компьютерный анализ 9326 научных источников.

Результаты. В исследованиях *in vitro* на культурах двух опухолевых клеточных линиях человека (ВТ-474 и А549) подтверждено цитотоксическое действие витамина В12 (аквакобаламин). Показано, что витамин В12 обладает слабыми цитотоксическими свойствами в диапазоне концентраций 3,125–200 мкг/л (IC₅₀>200 нМ), а его гидрофобное производное (гептаметиловый эфир цианаквакобириновой кислоты) заметно снижает выживаемость опухолевых линий клеток ВТ-474 и А549 при высоких концентрациях (100–200 мкг/л, IC₅₀~100 нМ). Подопытные животные с моделью КЛЛ *in vivo* легко переносили препарат на основе витамина В12 (аквакобаламин, 160 мкг/кг). Воздействие препарата до 21-х суток развития КЛЛ сопровождалось нарастающей тенденцией торможения роста опухоли на 10–20% (p=0,059). Результаты систематического анализа литературы *in silico* показывают, что клинические данные подтверждают выраженное противоопухолевое действие витамина В12.

Заключение. Клеточная модель указала на противоопухолевые свойства витамина В12 и его гидрофобного производного. При субхроническом внутрижелудочном введении В12 животным-опухоленосителям наблюдается устойчивая тенденция к торможению роста КЛЛ. Анализ клинических данных подтвердил целесообразность противоопухолевого использования витамина В12 по отдельности и в сочетании с витаминами-синергистами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Карцинома легких, клеточные модели, витамин В12, системная биология, биоинформатика, экспериментальная фармакология.

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ

Поступила: 22.12.2023. **В доработанном виде:** 04.03.2024. **Принята к печати:** 29.03.2024. **Опубликована онлайн:** 02.04.2024.

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

Громова О.А., Фролова Д.Е., Торшин И.Ю., Филимонова М.В., Сорокина М.А., Рейер И.А., Лиманова О.А., Федотова Л.Э., Майорова Л.А. Противоопухолевые эффекты витамина B12 *in vitro*, *in vivo*, *in silico*. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2024: [принятая рукопись]. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2024.231>.

Antitumor effects of vitamin B12 *in vitro*, *in vivo*, *in silico*

O.A. Gromova¹, D.E. Frolova², I.Yu. Torshin¹, M.V. Filimonova³, M.A. Sorokina⁴, I.A. Reyer¹, O.A. Limanova², L.E. Fedotova², L.A. Maiorova^{1,5}

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

² Ivanovo State Medical Academy (8 Sheremetevskiy Ave., Ivanovo 153012, Russian Federation)

³ Tsyba Medical Radiological Research Center – branch of Scientific Medical Research Center of Radiology (10 Marshal Zhukov Str., Obninsk 249031, Russia)

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University (1 Ostrovityanov Str., Moscow 117997, Russia)

⁵ Ivanovo State University of Chemistry and Technology (Sheremetevsky Ave., 7, Ivanovo 153012, Russia)

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

SUMMARY

Objective: to investigate the antitumor effects of various forms of vitamin B12 in combination with various synergistic vitamins and evaluate the prospects for clinical applications.

Material and methods. Cell lines BT-474 (breast ductal carcinoma) and A549 (lung carcinoma) were used as an *in vitro* cell model, and transplantable epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC) was used as an *in vivo* animal tumor model. Animal studies of LLC were carried out on 25 male F₁ hybrid mice (age 2.5–3 months, body weight 23–26 g). *In silico* research was conducted as a systematic computer analysis of 9,326 scientific sources.

Results. *In vitro* studies on cultures of two human tumor cell lines (BT-474 and A549) confirmed the cytotoxic effect of vitamin B12 (aquacobalamin). It has been shown that vitamin B12 has weak cytotoxic properties in the concentration range of 3.125–200 µg/L (IC₅₀>200 nM), and its hydrophobic derivative (heptamethyl cyanoquacobyric acid ester) significantly reduces the survival of tumor lines. BT-474 and A549 cells at high concentrations (100–200 µg/L, IC₅₀~100 nM). Experimental animals with an *in vivo* LLC model easily tolerated a drug based on vitamin B12. Exposure to the drug up to the 21st day of LLC development was accompanied by an increasing tendency to inhibit tumor growth by 10–20% (p=0.059). The results of a systematic *in silico* review of the literature show that clinical data confirmed the significant antitumor effect of vitamin B12.

Conclusion. The cellular model indicated the antitumor properties of vitamin B12 and its hydrophobic derivative. With subchronic intragastric administration of B12 to tumor-bearing animals, a steady tendency to inhibit the LLC growth was observed. Analysis of clinical data confirmed the feasibility of the antitumor use of vitamin B12 individually and in combination with synergistic vitamins.

KEYWORDS

Lung carcinoma, cell models, vitamin B12, systems biology, bioinformatics, experimental pharmacology.

ARTICLE INFORMATION

Received: 22.12.2023. **Revision received:** 04.03.2024. **Accepted:** 29.03.2024. **Published online:** 02.04.2024.

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’ contrubution

The authors contributed equally to this article.

For citation

Gromova O.A., Frolova D.E., Torshin I.Yu., Filimonova M.V., Sorokina M.A., Reyer I.A., Limanova O.A., Fedotova L.E., Maiorova L.A. Antitumor effects of vitamin B12 in vitro, in vivo, in silico. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2024: [accepted manuscript] (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2024.231>.

Основные моменты	Highlights
Что уже известно об этой теме?	What is already known about the subject?
Системно-биологический и биоинформационный анализ протеома человека показал, что витамины группы В являются универсальными модуляторами активности протеома	Systems biological and bioinformatics analyzes of the human proteome have shown that B vitamins are universal modulators of proteome activity
До недавнего времени дефицит витамина B12 и других витаминов группы В вообще не воспринимался как фактор канцерогенеза	Until recently, deficiency of vitamin B12 and other B vitamins was not generally perceived as a factor in carcinogenesis
Экспериментальных результатов, указывающих на то, что витамин B12 стимулирует рост злокачественных клеток, вообще не имеется	There are no experimental results indicating that vitamin B12 stimulates the growth of malignant cells
Что нового дает статья?	What are the new findings?
В исследованиях <i>in vitro</i> на культурах двух опухолевых клеточных подтверждено цитотоксическое действие аквакобаламина	<i>In vitro</i> studies on two tumor cell cultures confirmed the cytotoxic effect of aquacobalamin
При применении аквакобаламина у подопытных	When using aquacobalamin in experimental

животных с моделью перевиваемой эпидермоидной карциномы легких Льюис наблюдалась нарастающая тенденция торможения роста опухоли на 10–20%	animals with a model of transplantable epidermoid Lewis lung carcinoma, an increasing tendency to inhibit tumor growth by 10–20% was observed
Результаты систематического анализа литературы <i>in silico</i> подтвердили выраженное противоопухолевое действие витамина B12	The results of a systematic <i>in silico</i> analysis of the literature confirmed the pronounced antitumor effect of vitamin B12
Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?	How might it impact the clinical practice in the foreseeable future?
Компенсация недостаточности витамина B12 и его синергистов – эффективная и безопасная процедура повышения эффективности лечения пациентов в онкологическом стационаре	Compensation of vitamin B12 and its synergists deficiency is an effective and safe procedure for increasing the effectiveness of treatment for patients in an oncology hospital
Повышение обеспеченности витамином B12 может вызывать достоверное снижение смертности, тяжести различных опухолевых заболеваний, побочных эффектов химиотерапии	Increasing the supply of vitamin B12 can cause a significant reduction in mortality, the severity of various tumor diseases, and side effects of chemotherapy

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Системно-биологический и биоинформационный анализ протеома человека показал, что витамины группы В являются универсальными модуляторами активности протеома вследствие специфических коферментных и не-коферментных взаимодействий с белками. Коферментные эффекты витаминов обусловлены встраиванием в пространственные структуры ферментов, поддерживающих широкий круг метаболических реакций (синтез аденозинтрифосфата (АТФ) из углеводов, жиров и аминокислот, передача сигнала нейронах, рост клеток, синтез гормонов и др.). В постгеномной перспективе (т.е. при оценке воздействия на геном, транскриптом, протеом и метаболом) коферментные и некоферментные эффекты витаминов группы В задействуют около 1000 белков протеома человека.

До недавнего времени дефициты витамина B12 и других витаминов группы В вообще не воспринимались как фактор канцерогенеза. При этом, с одной стороны, было показано, что в различных видах злокачественных новообразований уровень витамина B12 повышен по сравнению с нормой. Также у пациентов с опухолевыми заболеваниями могут отмечаться повышенные уровни витамина B12 в плазме крови. С другой стороны, результаты многочисленных экспериментальных исследований показали, что витамин

В12 ингибирует рост опухолевых клеток. Более того, экспериментальных результатов, указывающих на то, что витамин В12 стимулирует рост злокачественных клеток, вообще не имеется [1].

Вследствие такого широкого спектра воздействия на протеом практически все витамины группы В проявляют противоопухолевые эффекты. Например, витамин В12, тиамин, рибофлавин, фолиевая кислота играют защитную роль против плоскоклеточного рака шейки матки [2]. При сниженных уровнях витамина В12 в сыворотке крови у женщин в постменопаузе риск развития рака молочной железы достоверно повышается [3]. Адьювантная терапия витаминами группы В снижает тяжелые токсические осложнения при проведении химиотерапии пациентов с немелкоклеточным раком легкого препаратом пеметрексед за счет снижения гипергомоцистеинемии и уровней метилмалоната в крови [4]. В частности, противоопухолевое действие витамина В12 обусловлено тем, что он необходим для обезвреживания гомоцистеина, метилирования ДНК, биосинтеза нуклеотидов, профилактики анемических состояний. Нарушение протекания этих процессов, происходящее на фоне дефицита витамина В12 и других витаминов группы В способствует канцерогенезу. Результаты клинических исследований показывают, что взаимосвязь между витамином В12 и риском опухолевых заболеваний опосредуется такими факторами, как потребление красного мяса, алкоголя и дефицитом витаминов группы В (прежде всего, фолатов). Перспективно использование препаратов витамина В12 у пациентов с опухолевыми заболеваниями [5].

В настоящей работе представлены результаты комплексного исследования противоопухолевых эффектов витамина В12, включая исследования клеточных культур, животных с моделью перевиваемой эпидермоидной карциномы легких Льюис (КЛЛ) и результаты клинических исследований.

Цель – исследовать противоопухолевые эффекты различных форм витамина В12 в сочетании с различными витаминами-синергистами и оценить перспективы клинических применений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

Исследования культур опухолевых клеток / Studies of tumor cell cultures

Эффекты аквакобаламина и гептаметилового эфира цианаквакобириновой кислоты (ГЭЦАКК) изучались на immortalized фибробластах линии Фб-hTERT, клеточных культурах карциномы легкого (A549) и рака протока молочной железы (BT-474). Линии A549, BT-474 и Фб-hTERT культивировали в питательных средах с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50

мкг/мл, L-глутамин 292 мкг/мл в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С с пересевом культур каждые 3–4 сут. Для открепления клеток от субстрата из культурального флакона удаляли питательную среду и промывали клетки 1 мл 0,02% раствора Версена, с последующим перенесением из монослоя в суспензию в полной питательной среде.

Для проведения МТТ-теста вещество МТТ растворяли в деионизированной воде (5 мг/мл), вносили 20 мкл совместно с вносили 5000 клеток в 100 мкл культуральной среды в каждую лунку 96-луночных микротитрационных планшетов и 28 ч инкубировали в CO₂ в стандартных условиях. Последовательные 2-кратные разведения исходного добавляли в лунки, затем 72 ч культивировали в CO₂ инкубаторе. По окончании инкубации культуральную среду удаляли автодозатором и вносили по 100 мкл ДМСО до появления фиолетового окрашивания. Планшет считывался планшет-ридером при 492 нм.

Лабораторные животные / Laboratory animals

Исследования проведены на 25 самцах мышей-гибридов F₁ (СВА×С₅₇BL_{6j}) в возрасте 2,5–3 мес с массой тела 23–26 г с разделением на опытную группу (n=15, применение производного витамина В12) и контроль (n=10). Животные были получены из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, имели ветеринарный сертификат и прошли 20-суточный карантин в виварии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба.

Этические аспекты / Ethical aspects

Содержались животные в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», в клетках Т-3 в условиях естественного освещения и принудительной 16-кратной вентиляции, при температуре 18–20 °С и относительной влажности воздуха 40–70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек, со свободным доступом к питьевой воде и корму. Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1 (ООО Лабораторснаб, Россия). Все работы с лабораторными животными выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами, на основе стандартных операционных процедур, принятых в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба, которые соответствуют правилам Европейской Конвенции по защите животных, используемых для научных целей (англ. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes Strasbourg, 1986 – ETS 123).

Опухолевая модель / Tumor model

Исследования проведены на перевиваемой карциноме легких Льюис (КЛЛ). Штамм КЛЛ получен из банка опухолевых материалов «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» и поддерживался на самцах мышей C₅₇BL_{6j}. Трансплантацию КЛЛ самцам мышей F₁ (CBA×C₅₇BL_{6j}) проводили подкожным введением $1,9 \times 10^6$ опухолевых клеток в 0,1 мл суспензии в область латеральной поверхности правого бедра.

Экспериментальные группы, способ введения и доза препарата / Experimental groups, method of drug administration and dose

Животных включали в опыт на 7-е сутки после перевивки КЛЛ, когда опухолевый узел уже сформировался и достигал измеряемого размера у всех мышей. Методом рандомизации животных распределили в две группы – контрольную (10 мышей) и подопытную (15 мышей). Животные контрольной группы в дальнейшем не получали никаких воздействий. Животным подопытной группы с 7-е по 20-е сутки после трансплантации КЛЛ ежедневно внутрижелудочно вводили препарат витамина В12 (аквакобаламин) в дозе 160 мкг/кг в 1% крахмальном геле, который изготавливали *ex tempore*.

Оценка эффектов / Effects evaluation

Переносимость препарата В12 оценивали путем ежедневного наблюдения за животными, в котором изучали неврологический статус по характеру спонтанной двигательной активности, общей возбудимости и реакции на тактильные и звуковые раздражители, а также по пищевой активности животных и динамике прироста их массы тела.

Влияние препарата В12 на опухолевый процесс изучали по динамике роста и активности метастазирования КЛЛ. Для этого каждые 3–4 сут у всех животных проводили измерение калипером двух диаметров опухолевых узлов: L – максимальный диаметр узла; W – диаметр, ортогональный к L, затем рассчитывали объем узла по формуле:

$$V = (L \times W^2) \times (\pi / 6),$$

которая хорошо коррелирует с данными магнитно-резонансной томографии [6].

На основании объема оценивали динамику роста КЛЛ по индексу торможения роста опухоли (ТРО) [7]:

$$TPO = (V_k - V_o) / V_k \times 100\%,$$

где V_k и V_o – средние объемы узлов в контрольной и опытной группах.

На 21-е сутки роста карциномы животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом, выделяли легкие, фиксировали их 24 ч в жидкости Буэна и далее проводили подсчет числа крупных и мелких легочных метастазов. Количественные оценки динамики роста и опухолевого метастазирования проводились посредством измерения параметров V и TPO на сутки 3, 7, 10, 13, 17 и 21. Метастазы относили к крупным или малым на основании экспертного анализа гистотопограмм срезов легких и печени групп, окрашенных по схеме «гематоксилин/эозин». Крупными считались метастазы размером более 200 мкм.

Систематический анализ литературы / Systematic literature analysis

По запросу «(Vitamin B12 OR cobalamin OR cyanocobalamin) AND (chemotherapy OR cancer OR tumor OR antitumor OR anti-tumor)» в базе данных биомедицинских публикаций PubMed/MEDLINE найдено 9326 статей. Мы провели системный компьютерный анализ массива публикаций с использованием методов топологического и метрического анализа больших данных, разрабатываемых в научной школе академика РАН Ю.И. Журавлёва и неоднократно описанных на страницах журнала [8].

Анализ основан на нахождении наиболее информативных терминов (ключевых слов, их сочетаний, рубрик МКБ-10, разделов международной номенклатуре Gene Ontology и др.) при сравнении выборки литературы с контрольной выборкой. В качестве контрольной использовалась выборка 9236 публикаций, случайно отобранных из массива 8,464,133 публикаций, найденных по запросу «(chemotherapy OR cancer OR tumor OR antitumor OR anti-tumor) NOT Vitamin B12 NOT cobalamin NOT cyanocobalamin» PUBMED. Все ключевые слова сортировались по эмпирическим функционалам информативности Рудакова-Торшина в контексте комбинаторной теории разрешимости [9]. Затем, производилось комбинаторное тестирование условие разрешимости (как описано в [9]) и из списка терминов выделялись только термины с наибольшей информативностью, которые принципиально необходимы для выполнимости условия разрешимости. В результате систематического анализа литературы было выделено 56 наиболее информативных биомедицинских терминов, отличающих тексты исследований по противоопухолевым эффектам витамина B12 от публикаций в контроле. На основании данного списка терминов осуществлялся дальнейший поиск и отбор источников.

Статистический анализ / Statistical analysis

Статистический анализ эффектов веществ в различных концентрациях проводили в Excel (Microsoft, США), Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США), OriginPro-8 (OriginLab Corp., США) по результатам расчета процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке. Графики в координатах «логарифм концентрации-жизнеспособность» анализировали нелинейными методами в OriginPro-8 и IC50 в мкг/л, затем в нмоль/л.

Для изученных параметров (масса тела, объем опухолевого узла, ТРО и т.д.) производился подсчет среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$) Статистический анализ данных по объему опухолевых узлов и значимости других межгрупповых различий проводили с помощью критерия Краскелла–Уолисса и теста Данна (т.е. Р-значения множественного сравнения Крускала–Уоллиса с поправкой Бонферрони. Иначе говоря, применение критерия Краскелла–Уоллиса для оценки статистической достоверности различий медиан трех и более независимых групп с последующим применением теста Данна). Различия полагали достоверными на уровне значимости 0,05.

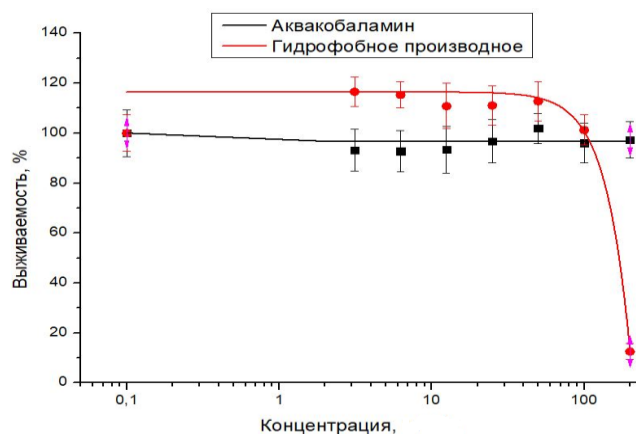
Расчеты выполнены с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft, США) и Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ / RESULTS AND DISCUSSION

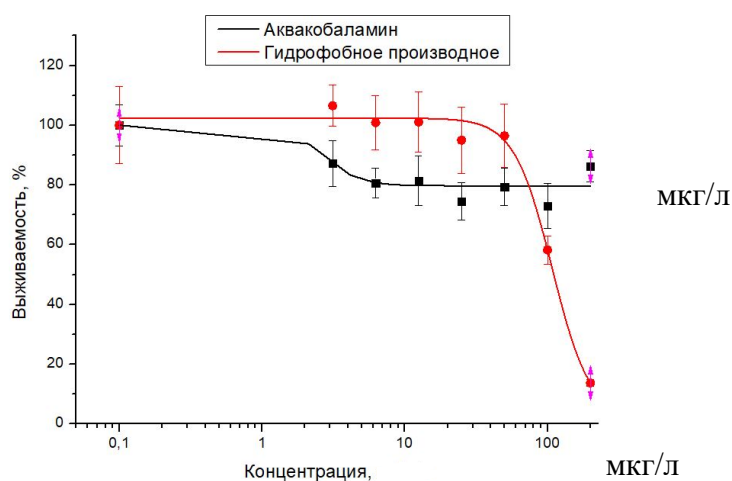
Экспериментальное исследование эффектов производных витамина В12 на опухолевых клеточных линиях А549 и ВТ-474 / Experimental study of vitamin B12 derivatives effects on tumor cell lines A549 and VT-474

При экспериментальном исследовании эффектов 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) и ВТ-474 (карцинома молочной железы человека, протоковая линия). На клеточной линии ВТ-474 заметны колебания в выживаемости клеток – до 73% при концентрации 100 мкг/л. Анализ графиков выживаемости обеих линий клеток в культуре (**рис. 1**) 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).

а



б



с

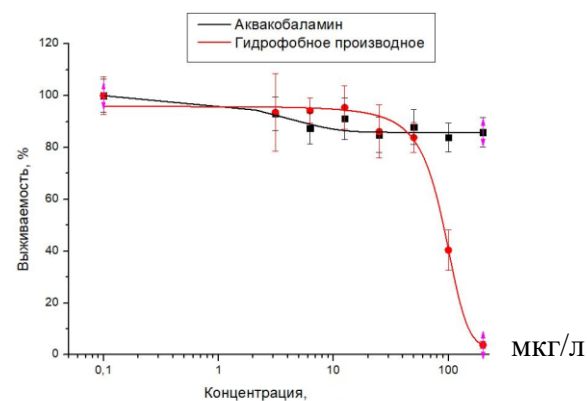


Рисунок 1. Сравнительные графики выживаемости опухолевых клеток в зависимости от концентраций гидрофобного производного и аквакобаламина:

а – линия A549 (аденокарциномные альвеолярные базальные эпителиальные клетки от пациента с раком легких); **б** – линия BT-474 (карцинома молочной железы человека, протоковая клеточная линия); **с** – Фб-hTERT (теломеризованные фибробласты кожи человека).

Figure 1. Comparative graphs of tumor cell survival depending on the concentrations of the hydrophobic derivative and aquacobalamin:

a – line A549 (adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells from a patient with lung cancer); **b** – VT-474 (human breast carcinoma, ductal cell line); **c** – Fb-hTERT (telomerized human skin fibroblasts)

Экспериментальные результаты для клеток линий VT-474 и A549 подтверждают результаты хемореактомного скрининга. Во-первых, в обоих случаях значения IC₅₀ для ГЭЦАКК существенно ниже, чем для аквакобаламина. Во-вторых, коэффициент пересчета с хемореактомных оценок на экспериментальные (т.е. отношение хемореактомного и экспериментального значений IC₅₀) весьма близок для обеих линий клеток и составляет 2,64 для VT-474 и 2,63 для A549. Таким образом, результаты хемореактомного скрининга для других опухолевых линий клеток (см. рис. 1) могут быть использованы для планирования последующих клеточных экспериментов с производными витамина B12.

Для оценки цитотоксических эффектов веществ важно оценить не только их воздействие на опухолевые клетки, но и на неопухолевые. В качестве таковых в настоящем исследовании были использованы теломеризованные фибробласты кожи человека (Фб-hTERT). На клеточной линии рака отмечены колебания в выживаемости клеток – до 83% при концентрации 100 мкг/л. Анализ кривой выживаемости фибробластов (см. рис. 1, c) показал низкую цитотоксичность аквакобаламина (IC₅₀>200 нМ) и цитотоксичность ГЭЦАКК, сопоставимую с воздействием на опухолевые клетки: IC₅₀ 90,4 мкг/л (85,2 нМ).

Для более адекватного восприятия последнего результата следует отметить, что клетки линии Фб-hTERT являются не вполне «нормальными» фибробластами кожи, а скорее, 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 [10].

Преимуществами клеток линии Фб-hTERT, делающих 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 Фб-hTERT показало существенные отличия в фенотипе и метаболических свойствах этих клеток. 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 трансформирующим фактором роста бета 1 (англ. transforming growth factor beta 1, 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). Результаты сравнительного исследования позволяют утверждать, что клетки Фб-hTERT менее жизнестойки, чем НФ человека, что отчасти объясняет полученные выше результаты анализа цитотоксичности ГЭЦАКК.

Модель КЛЛ у животных / LLC model in animals

Субхроническое внутрижелудочное введение препарата В12 в дозе 160 мкг/кг переносилось подопытными животными легко и не вызывало у них каких-либо изменений в неврологическом статусе, двигательной и пищевой активности. Не наблюдалось также и статистически значимых различий в динамике прироста массы тела животных в различных экспериментальных группах (табл. 1).

Таблица 1. Динамика средней массы тела животных в экспериментальных группах, г (M $\pm$ SD)

Table 1. Dynamics of animals' average body weight in experimental groups, g (M $\pm$ SD)

Группа	Период наблюдения				
	7-е сутки	10-е сутки	13-е сутки	17-е сутки	21-е сутки
Контроль (n=10)	25,9 $\pm$ 1,4	25,9 $\pm$ 1,6	27,1 $\pm$ 1,4	28,0 $\pm$ 1,3	28,9 $\pm$ 1,5
В12 (n=15)	25,7 $\pm$ 1,9	26,0 $\pm$ 1,7	26,5 $\pm$ 1,7	27,6 $\pm$ 1,9	29,1 $\pm$ 2,2

Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие различий в динамике роста массы тела, были установлены достоверные отличия в динамике стандартного отклонения массы тела (**рис. 2**). В то время как в контрольной группе стандартное отклонение массы тела сохранялось в диапазоне 1,2–1,5 г, в опытной группе отмечалось достоверное возрастание стандартного отклонения, т.е. разброса значений массы тела. Это указывает на возникающее в ходе применения препарата витамина В12 «расслоение» опытной группы животных на животных с более интенсивным и с менее интенсивным ростом массы тела. Существование такого расслоения является косвенным признаком действия препарата витамина В12, отличного от действия плацебо.

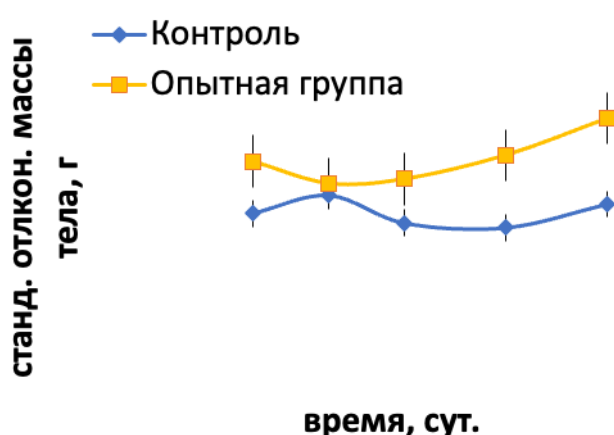


Рисунок 2. Динамика стандартного отклонения массы тела животных

Figure 2. Dynamics of the standard deviation of animals' body weight

Анализ динамики роста КЛЛ в различных группах показал, что уже через 3 сут от начала эксперимента препарат В12 вызывал у животных-опухоленосителей умеренное торможение роста КЛЛ – на 10–20% (**табл. 2**). Причем этот эффект не только был стабильным, но и усиливался на поздних сроках эксперимента – на 21-е сутки различие объемов опухолей в группах становится практически достоверным ($p=0,059$ по критерию Краскелла–Уоллиса и тесту Данна).

Таблица 2. Динамика роста среднего объема карциномы легких Льюис в экспериментальных группах животных, мм³ (M±SD)

Table 2. Dynamics of the growth of Lewis lung carcinoma average volume in animals' experimental groups, mm³ (M±SD)

Группа	Период наблюдения
--------	-------------------

	7-е сутки	10-е сутки	13-е сутки	17-е сутки	21-е сутки
Контроль (n=10)	30±14	243±99	547±128	1091±298	2612±804
B12 (n=15)	38±24	193±61	455±147	986±239	1999±409

Анализ пучка индивидуальных кривых скорости роста опухолей подтвердил достоверные различия между опытной и контрольной группами до 13-х суток (**рис. 3**). К 10-м суткам эксперимента отмечался тренд в снижении скорости роста опухоли ($p=0,07$), а к 13-м – достоверное снижение интенсивности роста опухолей ($p=0,045$).

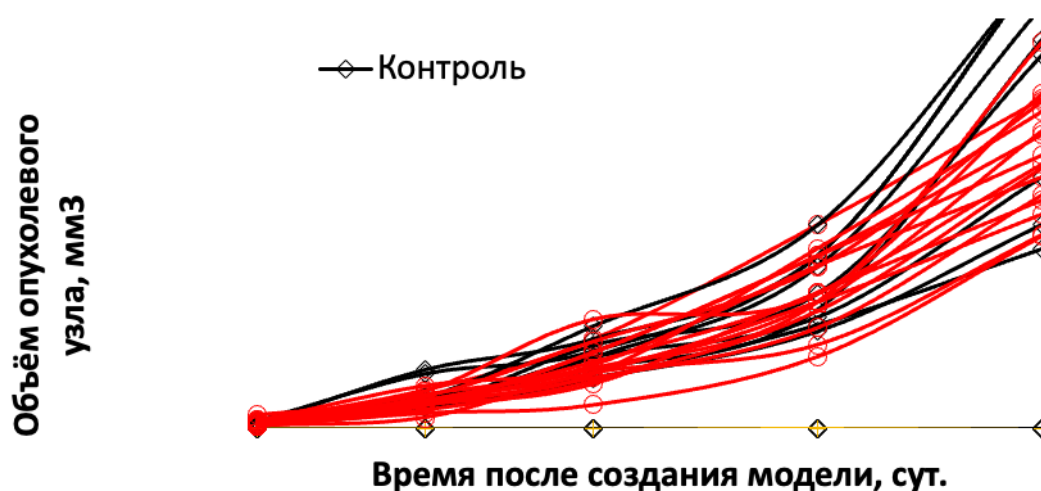


Рисунок 3. Кривые скорости роста опухолей для индивидуальных животных

Figure 3. Tumor growth rate curves for individual animals

Клинически значимого влияния на процессы метастазирования КЛЛ и рост легочных метастазов препарат В12 в этом опыте не оказывал (**табл. 3**).

Таблица 3. Число легочных метастазов в экспериментальных группах на 21-е сутки роста карциномы легких Льюис, n ($M \pm SD$)

Table 3. Number of pulmonary metastases in experimental groups on Day 21 of Lewis lung carcinoma growth, n ($M \pm SD$)

Группа	Метастазы		
	Крупные	Малые	Всего
Контроль (n=10)	10,6±6,6	53,9±35,6	64,5±39,6

B12 (n=15)	12,8±11,0	45,6±21,7	58,4±24,9
---------------	-----------	-----------	-----------

Результаты систематического анализа литературы / Results of systematic literature analysis

Витамины группы В проявляют противоопухолевые эффекты. В частности, крупномасштабное исследование взаимосвязи между потреблением витаминов группы В и риском рака молочной железы (n = 27 853, женщины ≥ 45 лет) включило наблюдения в течение 4 лет. Данные о рационе были собраны с использованием повторных 24-часовых записей и разработана база данных составов 8000 витаминно-минеральных комплексов (ВМК). Потребление витамина В6 с диетой (отношение шансов (ОШ) 0,74; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,55–0,99; p=0,05) и с ВМК (ОШ 0,61; 95% ДИ 0,38–0,98; p=0,05) было достоверно ассоциировано со сниженным риском рака молочной железы. Общее потребление тиамина (диета + ВМК) также соответствовало снижению онкориска (ОШ 0,78; 95% ДИ 0,61–1,00; p=0,05). Интересно отметить, что потребление витаминов снижало онкориск только у пациенток, которые практически не употребляют алкоголя и не способствовал снижению риска у алкоголь-зависимых женщин [11].

Систематический анализ воздействий витаминов В1, В6, В12 на протеом человека позволил выявить многочисленные синергидные взаимодействия витаминов В1, В6, В12 на молекулярном уровне, включающие метаболизм аминокислот, углеводов, липидов, формирование структур нейронов, кроветворение, синтез АТФ и др. Витамин В12 необходим для метаболизма липидов, кроветворения и регуляции деления клеток различных типов. Последнее важно, в частности, для проявления противоопухолевых свойства акфакобаламина и других форм витамина В12 [5].

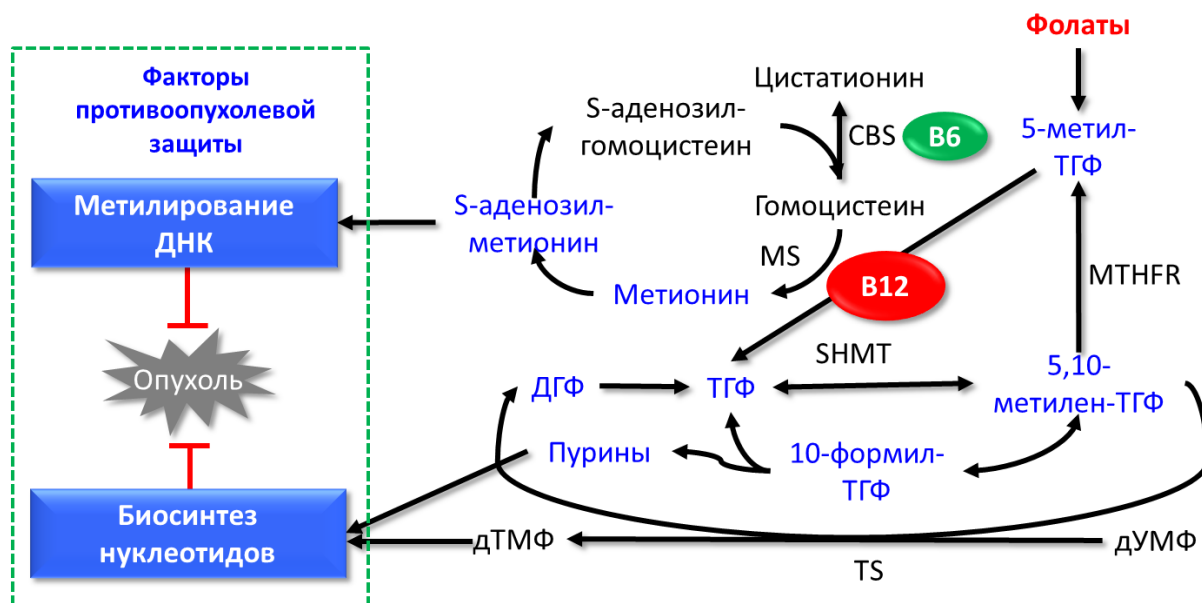
Дефицит витамина В12 наиболее часто встречается у пациентов в пожилом и старческом возрасте и затрагивает не менее 10–15% людей старше 60 лет [12]. Витамин В12 принципиально необходим для фолатного метаболизма и важен для обезвреживания гомоцистеина, метилирования ДНК, биосинтеза нуклеотидов, профилактики анемических состояний.

Последствия дефицита витамина В12 весьма разносторонни. Во-первых, при дефиците кофермента 5-дезоксиаденозилкобаламина накапливаются токсичные метилмалоновая и пропионовая кислоты, которые повреждают миелиновые оболочки, нейроны и провоцируют болевой синдром. Во-вторых, недостаток метилкобаламина нарушает синтез нуклеиновых кислот и метилирование ДНК, что приводит к расстройству образования и созревания эритроцитов, нарушению функции транспорта кислорода и,

следовательно, развитию анемического синдрома. Сниженные уровни витамина В12 в сыворотке крови также связаны с дисфункцией щитовидной железы [13]. В-третьих, нарушения фолатного метаболизма, обезвреживания гомоцистеина, метилирования ДНК, биосинтеза нуклеотидов, возникающие на фоне дефицита витамина В12, способствуют канцерогенезу. Результаты клинических исследований показывают, что взаимосвязь между витамином В12 и риском опухолевых заболеваний опосредуется такими факторами, как потребление красного мяса, алкоголя и дефицит других витаминов группы В [5].

Одним из наиболее явных проявлений дефицита витаминов В12, В6 и фолатов служит повышение уровней гомоцистеина, который является доказанным фактором риска цереброваскулярной патологии, а также коморбиден опухолевым заболеваниям. Например, средний уровень общего гомоцистеина у пациентов с ларингеальной карциномой (n=25) составил $2,84 \pm 1,62$ мг/л, в контрольной группе (n=80) – $0,99 \pm 0,24$ мг/л ($p < 0,001$) [14].

Витамин В12 является принципиально важным кофактором биосинтеза молекул-источников метильных групп (например, S-аденозилметионина) для метилирования ДНК и способствует переработке метилфолата в процессе биосинтеза нуклеотидов. Реметилирование гомоцистеина в метионин, катализируемое В12-зависимым ферментом метионин синтазой, играет важную роль в метаболизме метильной группы и метионина. Получающийся из гомоцистеина метионин преобразуется в S-аденозилметионин, который и является молекулой-источником метильной группы для реакций метилирования ДНК, РНК, липидов, белков и других молекул (**рис. 4**) [15].



CBS – цистатион-бета-синтетаза

MS – метионин синтетаза

SHMT – серингидроксиметил трансфераза

TS – тимидилат синтетаза

MTHFR – метилентетрагирофолат редуктаза

ДГФ – дигидрофолат

ТГФ – тетрагидрофолат

дУМФ – дезоксиуридинмонофосфат

дТМФ - дезокситимидинмонофосфат

Рисунок 4. Витамин B12 в фолатном обмене веществ. Дефицит витамина B12, кофактора метионин-синтазы, стимулирует дисбаланс метилфолата и последующие изменения в метилировании ДНК и биосинтезе нуклеотидов (адаптировано из [15])

Figure 4. Vitamin B12 in folate metabolism. Deficiency of vitamin B12, a cofactor for methionine synthase, stimulates methylfolate imbalance and subsequent changes in DNA methylation and nucleotide biosynthesis (adapted from [15])

Кобаламин потенцирует противоопухолевое действие химиотерапевтического препарата винбластин посредством снижения экспрессии гена «множественной лекарственной устойчивости» (англ. multiple drug resistance) – *MDR-1* в опухолевой линии клеток НерG2. Р-гликопротеин, синтезируемый из гена *MDR-1*, является одним из основных механизмов защиты клеток опухолей от противораковых препаратов. Добавление кобаламина в клетки привело к увеличению активности метионин синтетазы и значительному снижению экспрессии гена *MDR-1*. Иными словами, витамин B12 увеличил чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии винбластином. Кроме того, кобаламин усиливал чувствительность клеток к винбластину и предотвращал метотрексат-индуцированное повышение экспрессии гена *MDR-1* [16]. В результате

применения комбинации «винбластин + витамин В12» гибель опухолевых клеток возрастала.

Метаанализ эпидемиологических исследований показал значимое снижение риска при более высоких уровнях витамина В12 в сыворотке было установлено для исследований типа «случай – контроль» (отношение рисков (ОР) 0,74; 95% ДИ 0,56–0,98; $p=0,04$), но не для проспективных исследований. Метаанализ также подтвердил, что более высокие уровни пиридоксаль-5'-фосфата (активная форма витамина В6) в сыворотке достоверно ассоциированы со сниженным риском рака молочной железы [17] (рис. 5).

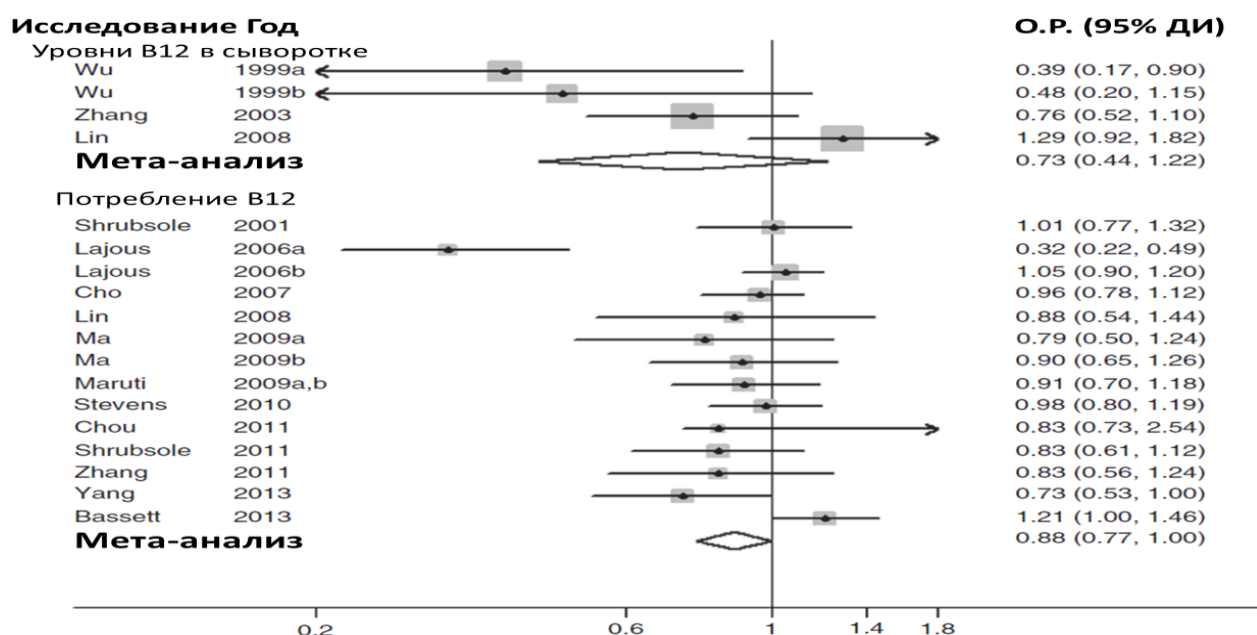


Рисунок 5. Риск рака молочной железы снижается при более высоких уровнях витамина В12 в сыворотке крови и при более высоком потреблении витамина В12 (по данным [17])

Figure 5. The risk of breast cancer is reduced with higher serum levels of vitamin B12 and with a higher intake of vitamin B12 (after [17])

Метаанализ 17 исследований ($n = 10\,601$) указал на дозозависимую ассоциацию между диетарным потреблением витамина В12 и риском развития колоректального рака: прирост ежесуточного потребления витамина В12 на 4,5 мкг/сут соответствовал снижению риска заболевания на 4% (ОР 0,96; 95% ДИ 0,93–1,00; $p<0,001$) [18]. Метаанализ относительного риска колоректального рака продемонстрировал снижение риска заболевания при более высоком потреблении витамина В12 (>8 мкг/сут). (рис. 6).

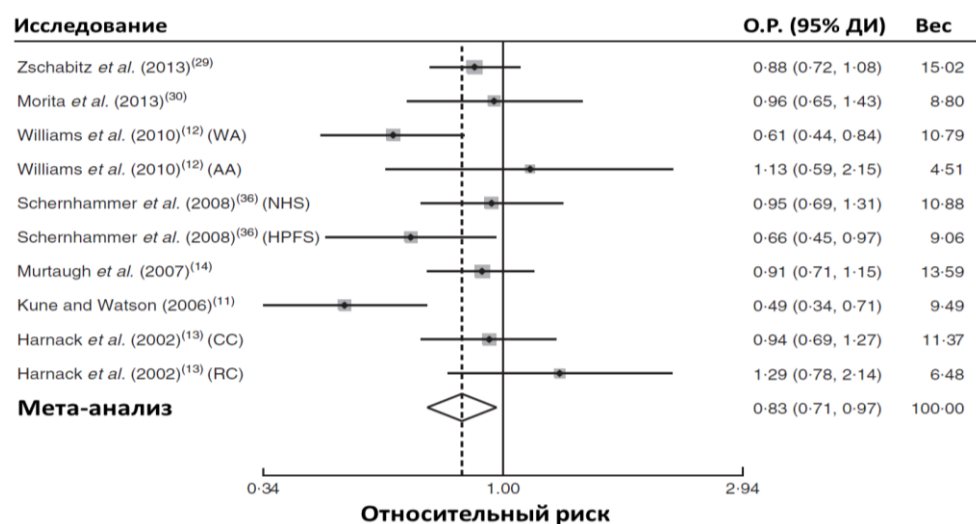


Рисунок 6. Метаанализ относительного риска колоректального рака (по данным [18])

Figure 6. A meta-analysis of the relative risk of colorectal cancer (after [18])

Показана перспективность использования препаратов витамина B12 в качестве адъювантной терапии у пациентов с опухолевыми заболеваниями, проходящих химиотерапию. Например, у больных, страдающих раком прямой кишки (n=37), проводилось лечение пеметрекседом (500 мг/сут) за 3 нед до операции, что существенно снижало уровни фолатов и B12 в биоптатах опухолевой ткани и в прилегающей слизистой оболочке. Адъювантная терапия фолиевой кислотой и витамином B12 *per os* не приводила к каким-либо нежелательным эффектам и позволяла компенсировать развивающиеся у пациентов глубокие дефициты витамина B12 и фолатов [19]. Таким образом, препараты витамина B12 могут быть весьма эффективны и безопасны для компенсации его дефицита, в частности после резекции желудка. Заметим, что мальабсорбция витамина B12 также происходит после тазового облучения для гинекологических опухолей (вследствие возникающей при этом энтеропатии) [20].

Перспективными направлениями таргетной модуляции свойств препаратов витамина B12 для адресной доставки лекарств являются химические модификации корринового ядра [21] и применение технологий микро- и нанокапсулирования [22]. Капсулирование витамина B12 в субмикронные капсулы позволяет снизить потери витамина в присутствии окислителей и обеспечить доставку витамина к целевым тканям за счет правильного подбора свойств нанокапсул, образующих супрамолекулярные ансамбли на границах раздела сред [23]. Подобные моно- и гетеромолекулярные наноструктуры, содержащие лекарственные средства, могут быть получены *in vitro* с последующим введением в организм для терапевтического эффекта или образоваться спонтанно при введении молекулярных растворов. Была показана экспериментальная

возможность самосборки соединений в 2D- и 3D-наноструктуры с контролируемыми свойствами [24, 25], в т.ч. с использованием производного витамина В12 – гептабутилового эфира аквацианокобировой кислоты [26]. Потенциально такие наночастицы могут демонстрировать важные преимущества перед витамином В12 с точки зрения взаимодействия с белками или с малыми лигандами [27].

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. Данные клетки имеют устойчивый фенотип, воспроизводимый до 200-го пассажа [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

В настоящей работе экспериментально проанализированы цитотоксические свойства аквакобаламина и его гидрофобного производного в концентрациях от 3,125 до 200 мкг/л на линиях клеток ВТ-474 и А549 и на животных с моделью КЛЛ. Аквакобаламин проявляет слабый цитотоксический эффект для клеточных линий ВТ-474 и А549 ($IC_{50} > 200$ нМ). На обеих линиях клеток гидрофобное производное ГЭЦАКК показало цитотоксические свойства при высоких концентрациях ($IC_{50} \sim 100$ нМ). При субхроническом внутрижелудочном введении препарата В12 животным-опухоленосителям в ежедневной дозе 160 мкг/кг наблюдается устойчивая тенденция к торможению роста КЛЛ. Антиметастатического действия при этом не отмечается.

Представлены результаты систематического анализа доказательных исследований, в которых были изучены эффекты витаминов у пациентов с опухолевыми заболеваниями. Крупномасштабные исследования и метаанализы указывают на достоверное снижение смертности, тяжести различных опухолевых заболеваний, побочных эффектов химиотерапии при более высокой обеспеченности витаминами. Результаты указывают на компенсацию недостаточности витаминов как эффективную и безопасную процедуру повышения эффективности лечения пациентов в онкологическом стационаре. При анализе экспериментальных и клинических данных по этому вопросу следует уделять особое внимание вопросам дозировки витаминов при монотерапии и при использовании в составе комплексов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Volkov I. The master key effect of vitamin B12 in treatment of malignancy – a potential therapy? *Med Hypotheses*. 2008; 70 (2): 324–8. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.05.029>.
2. 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>.
3. 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.
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., Гусев Е.И. Синергидные нейропротекторные эффекты тиамин, пиридоксин и цианокобаламина в рамках протеома человека. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017; 1: 40–51.
6. Kawano K., Hattori Y., Iwakura H., et al. Adrenal tumor volume in genetically engineered mouse model of neuroblastoma determined by magnetic resonance imaging. *Exp Ther Med*. 2012; 4 (1): 61–4. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.564>.
7. Хабриев Р.У. (ред.) Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-изд. М.: Медицина; 2005: 832 с.
8. Торшин И.Ю., Чучалин А.Г., Громова О.А. Об онкопротективных эффектах хондропротекторов: глюкозамина, хондроитина сульфата и неденатурированного коллагена II типа. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2023; 16 (4): 681–99. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2023.182>.
9. Журавлёв Ю.И., Рудаков К.В., Торшин И.Ю. Алгебраические критерии локальной разрешимости и регулярности как инструмент исследования морфологии аминокислотных последовательностей. *Труды МФТИ*. 2011; 3 (4): 45–54.
10. 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>.

11. Egnell M., Fassier P., Lécuyer L., et al. B-vitamin intake from diet and supplements and breast cancer risk in middle-aged women: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *Nutrients*. 2017; 9 (5): 488. <https://doi.org/10.3390/nu9050488>.
12. Baik H.W., Russell R.M. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19: 357–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.357>.
13. Orzechowska-Pawilojc A., Siekierska-Hellmann M., Syrenicz A., Sworczak K. Homocysteine, folate, and cobalamin levels in hyperthyroid women before and after treatment. *Endokrynol Pol*. 2009; 60 (6): 443–8.
14. Nacci A., Dallan I., Bruschini L., et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels in patients with laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134 (12): 1328–33. <https://doi.org/10.1001/archotol.134.12.1328>.
15. Choi S.W., Mason J.B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*. 2000; 130 (2): 129–32. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.129>.
16. Marguerite V., Beri-Dexheimer M., Ortiou S., et al. Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of MDR-1 gene expression in HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 20 (6): 967–76. <https://doi.org/10.1159/000110457>.
17. Wu W., Kang S., Zhang D. Association of vitamin B6, vitamin B12 and methionine with risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2013; 109 (7): 1926–44. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.438>.
18. 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>.
19. 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>.
20. Snijders-Keilholz A., Griffioen G., Davelaar J., et al. Vitamin B12 malabsorption after irradiation for gynaecological tumours. *Anticancer Res*. 1993; 13 (5C): 1877–81.
21. Торшин И.Ю., Громова О.А., Майорова Л.А. О перспективах применения производных витамина B12 в фармакологии. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2023; 16 (3): 501–11. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2023.198>.
22. Maiorova L.A., Erokhina S.I., Pisani M., et al. Encapsulation of vitamin B12 into nanoengineered capsules and soft matter nanosystems for targeted delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 182: 110366. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110366>.

23. Kharitonova N.V., Maiorova L.A., Koifman O.I. Aggregation behavior of unsubstituted magnesium porphyrazine in monolayers at air-water interface and in Langmuir–Schaefer films. *J Porphyrins Phthalocyanines*. 2018; 22 (6): 509–20. <https://doi.org/10.1142/S1088424618500505>.
24. Maiorova-Valkova L.A., Koifman O.I., Burmistrov V.A., et al. 2D M-nanoaggregates in Langmuir layers of calamite mesogen. *Prot Met Phys Chem Surf*. 2015; 51: 85–92. <https://doi.org/10.1134/S2070205115010074>.
25. 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>.
26. Maiorova L.A., Kobayashi N., Salnikov D.S., et al. Supramolecular 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>.
27. Dereven'kov I.A., Maiorova L.A., Koifman O.I., Salnikov D.S. High reactivity of supramolecular nanoentities of a vitamin B 12 derivative in Langmuir–Schaefer films toward gaseous toxins. *Langmuir*. 2023; 39 (48): 17240–50. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c02317>.
28. Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова Х.С. и др. Теломеризация – способ получения иммортальных клеток человека, сохраняющих нормальные свойства. *Онтогенез*. 2003; 34 (3): 183–92.

REFERENCES:

1. Volkov I. The master key effect of vitamin B12 in treatment of malignancy – a potential therapy? *Med Hypotheses*. 2008; 70 (2): 324–8. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.05.029>.
2. 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>.
3. 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.

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. Gromov O.A., Torshin I.Yu., Gusev E.I. Synergistic neuroprotective effects of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin on the level of human proteome. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017; 1: 40–51 (in Russ.).
6. Kawano K., Hattori Y., Iwakura H., et al. Adrenal tumor volume in genetically engineered mouse model of neuroblastoma determined by magnetic resonance imaging. *Exp Ther Med*. 2012; 4 (1): 61–4. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.564>.
7. Khabriev R.U. (Ed.) Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005: 832 pp. (in Russ.).
8. Torshin I.Yu., Chuchalin A.G., Gromova O.A. Oncoprotective effects of chondroprotectors: glucosamine, chondroitin sulfate and undenatured type II collagen. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2023; 16 (4): 681–99 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2023.182>.
9. Zhuravlev Yu.I., Rudakov K.V., Torshin I.Yu. Algebraic criteria for local solvability and regularity as a tool to investigate the morphology of amino acid sequences. *Trudy MFTI*. 2011; 3 (4): 45–54 (in Russ.).
10. 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>.
11. Egnell M., Fassier P., Lécuyer L., et al. B-vitamin intake from diet and supplements and breast cancer risk in middle-aged women: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *Nutrients*. 2017; 9 (5): 488. <https://doi.org/10.3390/nu9050488>.
12. Baik H.W., Russell R.M. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19: 357–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.357>.
13. Orzechowska-Pawilojc A., Siekierska-Hellmann M., Syrenicz A., Sworczak K. Homocysteine, folate, and cobalamin levels in hyperthyroid women before and after treatment. *Endokrynol Pol*. 2009; 60 (6): 443–8.
14. Nacci A., Dallan I., Bruschini L., et al. Plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels in patients with laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134 (12): 1328–33. <https://doi.org/10.1001/archotol.134.12.1328>.
15. Choi S.W., Mason J.B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*. 2000; 130 (2): 129–32. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.129>.

16. Marguerite V., Beri-Dexheimer M., Ortiou S., et al. Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of MDR-1 gene expression in HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 20 (6): 967–76. <https://doi.org/10.1159/000110457>.
17. Wu W., Kang S., Zhang D. Association of vitamin B6, vitamin B12 and methionine with risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2013; 109 (7): 1926–44. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.438>.
18. 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>.
19. 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>.
20. Snijders-Keilholz A., Griffioen G., Davelaar J., et al. Vitamin B12 malabsorption after irradiation for gynaecological tumours. *Anticancer Res*. 1993; 13 (5C): 1877–81.
21. 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>.
22. Maiorova L.A., Erokhina S.I., Pisani M., et al. Encapsulation of vitamin B12 into nanoengineered capsules and soft matter nanosystems for targeted delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 182: 110366. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110366>.
23. Kharitonova N.V., Maiorova L.A., Koifman O.I. Aggregation behavior of unsubstituted magnesium porphyrine in monolayers at air-water interface and in Langmuir–Schaefer films. *J Porphyrins Phthalocyanines*. 2018; 22 (6): 509–20. <https://doi.org/10.1142/S1088424618500505>.
24. Maiorova-Valkova L.A., Koifman O.I., Burmistrov V.A., et al. 2D M-nanoaggregates in Langmuir layers of calamite mesogen. *Prot Met Phys Chem Surf*. 2015; 51: 85–92. <https://doi.org/10.1134/S2070205115010074>.
25. 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>.
26. Maiorova L.A., Kobayashi N., Salnikov D.S., et al. Supramolecular 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>.

27. Dereven'kov I.A., Maiorova L.A., Koifman O.I., Salnikov D.S. High reactivity of supermolecular nanoentities of a vitamin B 12 derivative in Langmuir–Schaefer films toward gaseous toxins. *Langmuir*. 2023; 39 (48): 17240–50.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c02317>.

28. 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.).

=====

Сведения об авторах

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.

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.

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., профессор, заведующая лабораторией радиационной фармакологии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Обнинск, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9690-4746>; Scopus Author ID: 36894092800; РИНЦ SPIN-код: 3344-9998.

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.

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.

Лиманова Ольга Адольфовна – к.м.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» (Иваново, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2342-3036>.

Федотова Любовь Эдуардовна – к.м.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» (Иваново, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9778-1562>.

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.

About the authors

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.

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.

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). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9690-4746>; Scopus Author ID: 36894092800; RSCI SPIN-code: 3344-9998.

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.

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.

Olga A. Limanova – MD, PhD, Associate Profesor, Chair of Pharmacology, Ivanovo State Medical Academy (Ivanovo, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2342-3036>.

Lyubov E. Fedotova – MD, PhD, Associate Profesor, Chair of Pharmacology, Ivanovo State Medical Academy (Ivanovo, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9778-1562>.

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: 58079684100; RSCI SPIN-code: 7190-2147.