

Joanna Katarzyńska

joanna.katarzynska@p.lodz.pl

Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

Potencjał aplikacyjny witaminy B12 i jej analogów

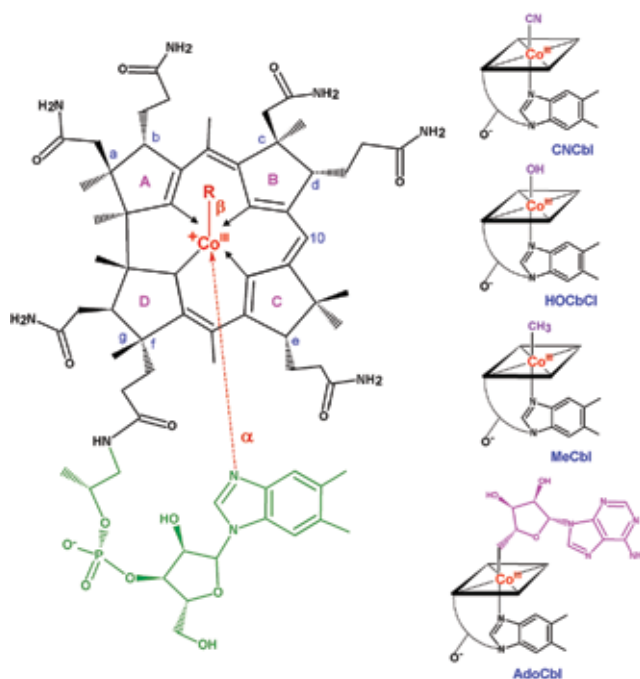
Wstęp

Aktywność biologiczna witaminy B12 na poziomie komórkowym nierozzerwalnie łączy się ze szlakiem metabolicznym kwasu foliowego, a że właśnie wśród analogów kwasu foliowego (antywitaminy B9) odkryto leki, które zrewolucjonizowały chemię medyczną XX wieku (sulfanilamid, metotreksat), nie powinno więc dziwić duże zainteresowanie poświęcone również antyvitaminom B12. Przez wiele lat, zwłaszcza w latach 60 – 70-tych ubiegłego wieku, intensywnie poszukiwano potencjalnych leków wśród antykoobalamin [1]. Niestety, jak dotąd, żadna antyvitamina B12 nie została dopuszczona do obrotu, ani nawet nie przechodzi badań klinicznych. Co więcej, pojęcie antyvitaminy B12 zniknęło z literatury praktycznie na trzy dekady. Obecnie dokonujący się postęp w wielu dziedzinach nauki i techniki zachęcił prężne ośrodki badawcze do wszczęcia kolejnych prób znalezienia interesującej struktury, wpływającej na szlak metaboliczny B12, zwłaszcza do zastosowań medycznych. Wymienić tu chociażby należy zespół prof. Zeldera z Uniwersytetu w Zurychu, prof. Krautlera z Uniwersytetu w Innsbrucku czy prof. Gryko z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie [1-7], ale to oczywiście tylko niektóre przykłady, bo temat został już podjęty przez badaczy ze wszystkich kontynentów. Być może przeżywany renesans zainteresowania kobalaminami zaowocuje wkrótce nowymi odkryciami.

Witamina B12 i jej naturalne, aktywne metabolicznie kofaktory

Trudności w znalezieniu skutecznych antyvitamin B12 związane są ze specyficzną strukturą kobalamin [8]. Kobalaminy zostały wyizolowane w latach 40-tych XX wieku [9]. Są to związki kompleksowe o barwie czerwonej z centralnie ulokowanym atomem kobaltu (rys.1). Szkielet cząsteczki stanowi makrocykliczny 14 π elektronowy układ korynowy z czterema pierścieniami pirolu w formie zredukowanej. Jon kobaltu na stopniu utlenienia +3 ma 6 ligandów i połączony jest trzema wiązaniami koordynacyjnymi z atomami azotu pierścieni pirolowych A, B, C oraz jednym wiązaniem

koordynacyjnym z dolnym ligandem α , usytuowanym prostopadle do płaszczyzny pierścienia. Poza tym posiada dwa wiązania kowalencyjne: jedno z atomem azotu N²³ pierścienia pirolu D, a drugie skierowane prostopadle nad powierzchnię układu makrocyklicznego z ligandem β . Wiązanie z ligandem β jest labilne, dlatego też ligand β może być stosunkowo łatwo wymieniany na inne podstawniki, takie jak grupa nitylowa (CN) w cyjanokobalaminie (CNCbl), metylowa (CH₃) w metylokobalaminie (MeCbl), hydroksylowa (OH) w hydroksykobalaminie (HOCbl), OH x H₂O w akwakobalaminie (H₂O Cbl), 5'-deoksyadenozylowa w adenozylokobalaminie (AdoCbl), nityrowa (NO₂) w nitrokobalaminie (NO₂Cbl), itp. W przeciwieństwie do górnego liganda β , dolny ligand α jest stosunkowo stabilny i stanowi go pierścień 5,6-dimetylobenzimidazolowy, związany z resztą rybozolo-3'-fosforanową, połączoną poprzez łącznik N-metyloetylopropanoamidowy z atomem C¹⁷ pierścienia D koryny.



Rys.1. Rodzina najważniejszych, z punktu widzenia przemian metabolicznych, kobalamin (B12): cyjanokobalamina (CNCbl), hydroksykobalamina (HOCbl), metylokobalamina (MeCbl), adenozylokobalamina (AdoCbl)

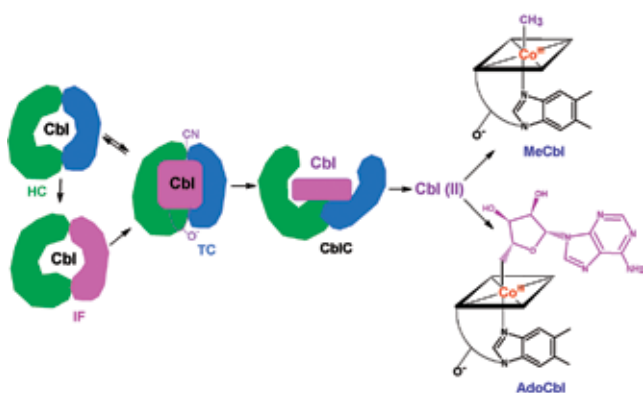


Witamina B12 może być produkowana tylko przez pewne mikroorganizmy, dlatego też w przypadku ssaków musi być suplementowana wraz z pożywieniem (podroby: wątroba, nerki, a także ryby, jaja). Proces wchłaniania kobalaminy stanowi wyzwanie z powodu jej wyrafinowanej struktury. Wymaga udziału trzech różnych białek transportowych: czynnika wewnętrznego wydzielanego przez komórki żołądka (IF), haptokoryny (HC) i transkobalaminy II – białka osocza (TCII) (rys.2) [10, 11].

Ustalono, że cząsteczka B12 ulega enkapsulacji przez powierzchnie podjednostek białkowych w taki sposób, że tylko dwa jej fragmenty są eksponowane, tzn. grupa 5'OH reszty rybozy oraz ligand β (najczęściej grupa nitrylowa).

Po wnikięciu na drodze endocytozy za pośrednictwem receptorów w nabłonku jelita kobalamina jest metabolizowana do katalitycznie aktywnych kofaktorów metaloorganicznych, a mianowicie: w cytoplazmie do metylokobalaminy (MeCbl) oraz w mitochondriach do adenozylokobalaminy (AdoCbl). Każda z tych struktur wymaga zmiany liganda β , a reakcja katalizowana jest przez enzym CblC (deligazę – enzym naprawczy), katalizujący reduktywną denitrylację, ale i dealkilację [12]. Reduktywne usunięcie grupy nitrylowej prowadzi do cob(II)alaminy, która jest bezpośrednim substratem dla aktywnych form MeCbl i AdoCbl.

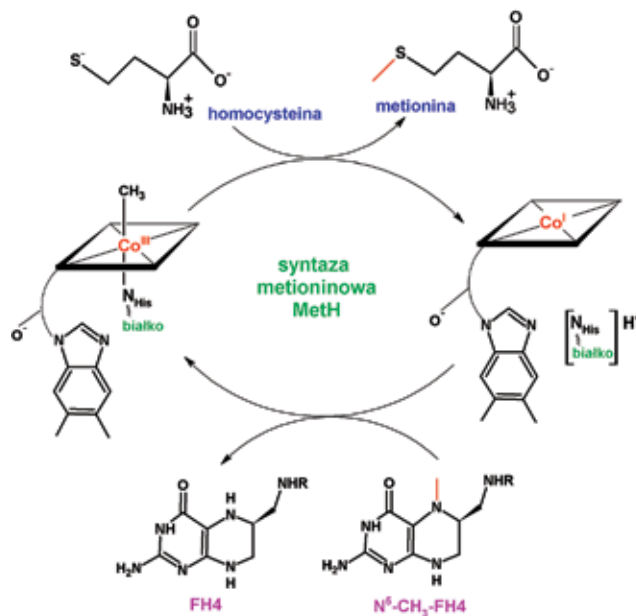
Upośledzenie funkcji enzymu CblC, np. w wyniku mutacji, blokuje cykl komórkowy zależny od witaminy B12 i może być przyczyną anemii złośliwej [13]. Należy zauważyć, że w takim przypadku suplementacja witaminy B12 jest niewystarczająca, ponieważ wchłaniana jako CNCbl nie może być przekształcona do wymaganych aktywnych katalitycznie kofaktorów: MeCbl i AdoCbl, niezbędnych w przemianach metabolicznych białek, tłuszczów, węglowodanów, czy kwasów nukleinowych.



Rys. 2. Schemat transportu witaminy B12 przez błonę komórkową z udziałem białek pomocniczych: czynnika wewnętrznego (IF), haptokoryny (HC) i transkobalaminy (TC) z następczą transformacją kobalaminy do aktywnych kofaktorów MeCbl i AdoCbl

Szlaki metaboliczne witaminy B12

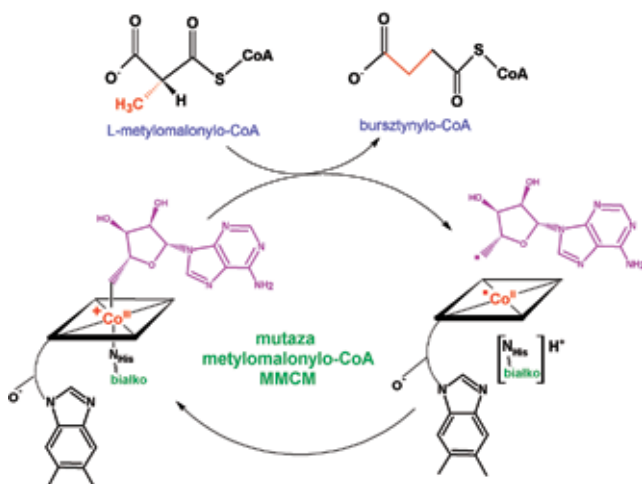
Aktywne metabolicznie cząsteczki kobalaminy MeCbl i AdoCbl są kofaktorami niezbędnymi do działania syntazy metioninowej (MetH) oraz mutazy metylomalonylo-CoA (MMCM), które to enzymy uczestniczą m.in. w reakcjach metylacji w organizmie [14]. MetH katalizuje reakcję przeniesienia grupy metylowej z 5-metylotetrahydrofolianu (N^5 - CH_3 -FH4) do homocysteiny (Hcy), prowadzącą do otrzymania tetrahydrofolianu (FH4) i metioniny (Met) (rys. 3). Proces ten wymaga udziału MeCbl, która pośredniczy w przekazaniu grupy metylowej do homocysteiny. W początkowym etapie, na skutek ataku nukleofilowego homocysteiny na akasjalnie usytuowaną grupę metylową kofaktora metylokobalaminowego, tworzy się metionina oraz kompleks zawierający atom Co na +1 stopniu utlenienia. W dalszym etapie powstały supernukleofil ulega utlenieniu w następczej reakcji przeniesienia grupy metylowej z udziałem N^5 - CH_3 -FH4, w wyniku czego odtworzona zostaje struktura kofaktora MeCbl oraz FH4. Dzięki poznaniu cyklu przemian z udziałem MeCbl łatwo zrozumieć, dlaczego szybko dzielące się komórki, takie jak komórki nowotworowe zużywają większe ilości witaminy B12 w porównaniu z komórkami zdrowymi [15]. Po prostu replikacja komórek nie jest zależna jedynie od kwasu foliowego, lecz jest również bezpośrednio połączona z metabolizmem witaminy B12.



Rys. 3. Szlak metaboliczny B12 z udziałem syntazy metioninowej (MetH) i metylokobalaminy (MeCbl)

Innym ważnym procesem zachodzącym za pośrednictwem B12 (w formie kofaktora AdoCbl) jest reakcja rodnikowa katalizowana przez mutazę metylomalonylo-CoA,

polegająca na przekształceniu metylomalonylo-CoA do sukcyinylo-CoA (rys. 4). Wspomniana reakcja izomeryzacji kwasu metylomalonowego do kwasu bursztynowego jest częścią przemian, w wyniku których degradacja rozgałęzionych aminokwasów (np. Val), nieparzystych kwasów tłuszczowych czy cholesterolu prowadzi do powstania propionilo-CoA. Powstały propionian po przekształceniu do sukcyinylo-CoA zostaje wprowadzony do cyklu przemian pirogronianu (cyklu kwasu cytrynowego).



Rys. 4. Szlak metaboliczny B12 z udziałem mutazy metylomalonylo-CoA (MMCM) i adenozylokobalaminy (AdoCbl)

Z przedstawionych opisów roli B12 jako koenzymu istotnego w przemianach węglowodanów, białek, tłuszczów czy nukleotydów wynika, że akumulujące się homocysteina i kwas metylomalonowy powinny być wszechstronnymi biomarkerami niedoboru B12 wskazującymi, że działanie enzymów MetH i MMCM jest nieprawidłowe [16]. Choć z drugiej strony takim biomarkerem może być również brak metioniny i kwasu foliowego [17].

Wiele badań z ostatnich lat wskazuje, że witamina B12 jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania mózgu. Niedobory B12 w mózgu (ale nie w surowicy) zaobserwowano u osób w podeszłym wieku, obciążonych chorobą Alzheimera oraz u pacjentów z autyzmem, jak również cierpiących na schizofrenię [18]. Za niedobory te może być odpowiedzialny wadliwy transport B12 do i z płynu mózgowo-rdzeniowego poprzez barierę nabłonka nerwowego splotu naczyniówkowego. Przypuszcza się, że w transporcie tym uczestniczy między innymi tandem endocytarnych receptorów: kubilina i megalina. Co ciekawe, megalina promuje usuwanie białka pochodzącego z peptydu prekursorowego amyloidu Aβ, w związku z tym to właśnie związany z wiekiem spadek funkcji megaliny może przyczyniać się do wzrostu poziomu Aβ w mózgu w chorobie Alzheimera. Sugeruje się, że wraz

z wiekiem (> 40 lat) następuje normalny, skoordynowany spadek w transporcie witaminy B12 do mózgu i Aβ na zewnątrz mózgu i dopiero pewne czynniki środowiskowe i genetyczne mogą wprowadzać zwiększone ryzyko zaburzeń neurodegeneracyjnych. Ponadto postuluje się, że nieprawidłowa aktywność megaliny występuje też w chorobach autoimmunologicznych na skutek obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciw temu transbłonowemu receptorowi. Jednocześnie zauważyć należy, że około 75% osób autystycznych produkuje przeciwciała wykazujące zdolność do blokowania receptora folianowego, pośredniczącego w transporcie kwasu foliowego w splotie naczyniówce.

Tak więc ograniczenie funkcji megaliny prowadzi do upośledzenia nie tylko transportu B12, ale i kwasu foliowego, a w konsekwencji przyczynia się do ograniczonej aktywności syntazy metioninowej MS i zaburzenia procesów metylacji DNA. Zmiany w DNA na skutek metylacji są m. in. podstawą mechanizmu powstawania pamięci i zdolności mózgu do uczenia się. Receptor D4 dopaminy, pośredniczący w metylacji fosfolipidów, jest całkowicie zależny od aktywności syntazy metioninowej, a aktywacja tego receptora D4 sprzyja synchronizacji częstotliwości sieci neuronowej gamma podczas koncentracji uwagi. Zatem kluczową rolę w procesach uwagi i uczenia się wydają się odgrywać właśnie aktywne kofaktory metylokobalamina (MeCbl) i adenozylokobalamina (AdoCbl). Odkryto, że poziomy MeCbl i AdoCbl w korze czołowej osób autystycznych i schizofreników są 3-krotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną dla danego przedziału wiekowego przy jednocześnie pozostającym w normie poziomie B12 w osoczu. Równocześnie zaobserwowano niski poziom zredukowanej formy glutationu w osoczu, co jest też charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego (glutation – naturalnie występujący w komórkach przeciwutleniacz uczestniczący w metabolizmie B12). Tak więc patologiczne zaburzenia mózgu, choroby neurologiczne i neuropsychiatryczne mogą być wynikiem zaburzeń reakcji redoks/metylacji, zachodzących w systemach metabolicznych, które wspierają normalne funkcjonowanie komórek nerwowych i mózgu w ciągu życia.

Antywitamina B12

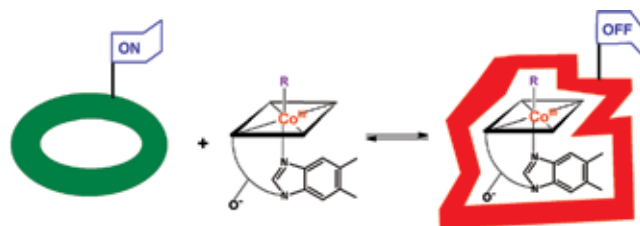
Antywitamina B12 ograniczają bądź uniemożliwiają wykorzystanie przez organizm naturalnej witaminy B12, która, jak już wspomniano, ma różnorodne funkcje w organizmie. Nade wszystko dokładnie poznano rolę witaminy B12 w wytwarzaniu czerwonych krwinek i otoczki mielinowej komórek nerwowych, stąd wiadomo na pewno, że niedobór witaminy B12 powoduje niedokrwistość i choroby zwyrod-



nieniowe ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, objawiające się zmęczeniem i utrzymującymi się stanami rozdrażnienia, depresją, drętwieniem rąk i nóg, trudnościami w chodzeniu, jękiem się itp. [17]. Nasuwa się więc pytanie o rolę potencjalnych antywitamin B12 w zastosowaniach medycznych. Czy korzyści z użycia antywitamin B12 przewyższą efekty uboczne, jakie niewątpliwie pojawią się, zważywszy na ogromną rolę B12 dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego?

Powszechnie znanym przykładem antywitaminy B12 jest podtlenek azotu, podawany przez anestezjologów podczas znieczulenia, ponieważ utlenia zredukowaną formę B12 – Cob(I)alaminę, która jest substratem dla MetH, w wyniku czego zablokowane zostaje uwalnianie FH4 i Met [19]. Jeśli zaś chodzi o analogi strukturalne B12, to jak dotąd, z punktu widzenia chemii medycznej, niemożliwe okazało się znalezienie takiej cząsteczki, która wykazując wysokie podobieństwo strukturalne do naturalnej witaminy B12, jednocześnie zapobiegałaby metabolicznej konwersji do kluczowych metaloorganicznych kofaktorów B12 bez wywoływania niepożądanych efektów ubocznych w organizmie żywym. Dowiedziono, że syntetyczne analogi witaminy B12 o aktywności niwelującej działanie B12 powodowały zmiany degeneracyjne mózgu, choroby nerwowe, zmiany w dostępności ważnych czynników wzrostowych, zmienione profile proliferacji komórkowej, zaburzenia reprodukcji i rozwoju, jednym słowem ich działanie w niczym nie różniło się od efektów będących następstwem podania trucizny [3].

Uważa się jednakże, że antywitaminy B12 mogą mieć ogromny potencjał jako źródło nowych związków o właściwościach antyproliferacyjnych, a przede wszystkim do zwalczania bakterii, które używają witaminy B12 w swoich szlakach metabolicznych, a nabyły oporności w stosunku do obecnie stosowanych antybiotyków [20, 21]. Duże znaczenie ma tutaj zwłaszcza niedawno poznany mechanizm regulacji szlaków metabolicznych z udziałem ryboprzełączników bakteryjnych zależnych od witamin [22], a także fakt odkrycia niebagatelnej roli B12 w komunikowaniu się mikrobów [15]. Regulatorowa rola kobalaminy w komórkach bakteryjnych w uproszczeniu polega głównie na inicjowaniu korzystnych oddziaływań międzycząsteczkowych z makromolekułami typu białka czy RNA, w wyniku czego następuje zmiana ich przestrzennej struktury, tzn. biomakromolekuła, ulegając aktywacji, może przechodzić ze stanu „off” do formy „on” i na odwrót (rys. 5). Np. andenozylokobalamina łącząc się z fragmentem RNA Btub *E. coli* hamuje ekspresję genu odpowiedzialnego za produkcję białka transportującego B12 przez błonę komórkową, blokując tym samym wchłanianie tej witaminy.



Rys. 5. Schematyczny obraz regulacyjnej roli B12 w promowaniu oddziaływań z makromolekułami, czego następstwem jest zmiana ich budowy przestrzennej i aktywności

Z drugiej strony antywitaminy B12 mogą być też użyteczne w wyjaśnianiu zaskakujących patofizjologicznych zjawisk związanych z metabolizmem macierzystej witaminy. Podanie antywitamin B12 zdrowym zwierzętom wywołuje objawy deficytu tej witaminy, co może być przydatne w badaniach niedoboru B12 prowadzonych na modelach zwierzęcych. Zwykle w takich przypadkach rutynowo usuwa się żołądek u myszy, co jest metodą bardzo inwazyjną i niehumanitarną. Na pewno lepszym rozwiązaniem byłoby podanie skutecznej antywitaminy B12, zwłaszcza w postaci metabolicznie obojętnej, której działanie można by było cofnąć po zakończonym teście [5].

Dotychczas skutecznych antywitamin B12 poszukiwano w oparciu o hipotezę tzw. „pułapki metylofolianowej”. Hipoteza „pułapki metylofolianowej” została wysunięta w latach 70-tych XX wieku i zakładała taką interakcję antywitaminy B12 z enzymem MetH, w wyniku której enzym tracił zdolność do uwalniania FH4, konsekwencją czego były zakłócenia w syntezie DNA, jak i podziale komórkowym [15, 23, 24]. Samo inhibowanie enzymu mogło zachodzić na skutek: 1) blokady w dostarczaniu witaminy B12 do komórki, 2) poprzez uniemożliwienie transformacji B12 do aktywnych metaloorganicznych kofaktorów, bądź też 3) w wyniku bezpośredniego zahamowania aktywności enzymatycznej [25, 26]. Na podstawie wieloletnich badań zaobserwowano, że MetH wykazuje niską specyficzność w stosunku do strukturalnych analogów B12, co z kolei doprowadziło do wniosku, że najbardziej atrakcyjnymi i rozsądnymi celami terapeutycznymi powinny być białka zaangażowane w wychwyt, transport czy metabolizm witaminy B12 (przypuszczenie to okazało się skądinąd trafne, zwłaszcza w aktualnym kontekście regulacyjnej roli kobalaminy z udziałem ryboprzełączników).

Otrzymane dotąd antywitaminy B12 można podzielić na trzy kategorie w zależności od miejsca dokonanej modyfikacji:

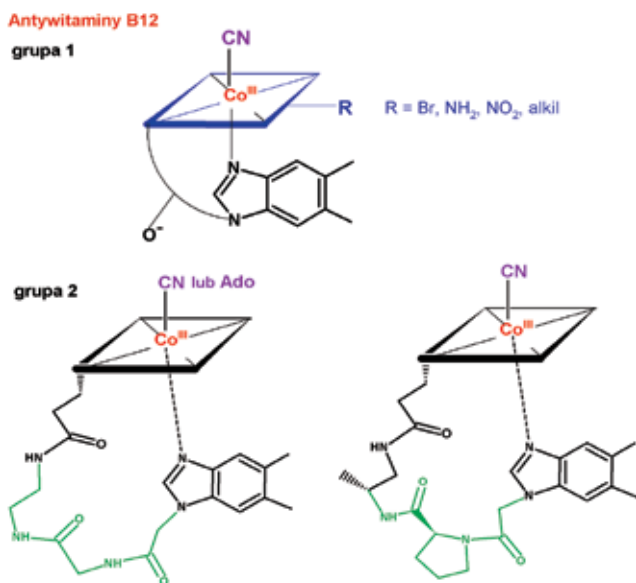
- 1) **grupa 1** – analogi ze zmodyfikowanym makrocyklicznym układem korynowym,
- 2) **grupa 2** – związki posiadające zmiany strukturalne

w obrębie fragmentu 5,6-dimetylobenzimidazolorybozo-3'-fosforanowego,

3) **grupa 3** – kompleksy, które mają wymieniony atom metalu i/lub β -ligand usytuowany aksjalnie ponad płaszczyzną układu korynowego [1].

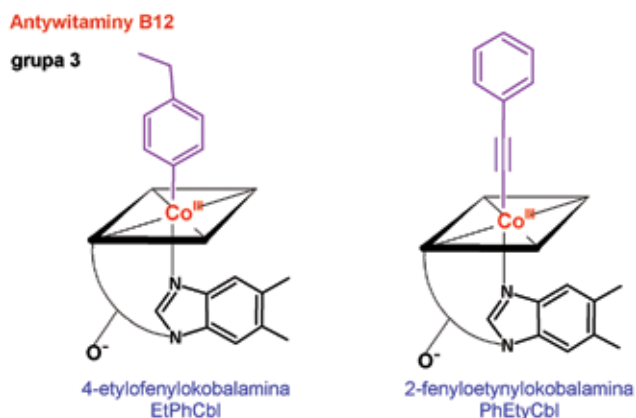
Główną strategią podjętą przy ich projektowaniu było opracowanie takich struktur, które wciąż byłyby rozpoznawane przez odpowiednie cele biologiczne i jednocześnie wykazywałyby zwiększone do nich powinowactwo w porównaniu do naturalnych kofaktorowych substratów. Stąd zsyntezowano wiele analogów witaminy B12, posiadających modyfikacje praktycznie we wszystkich możliwych pozycjach, wykonano dla nich testy enzymatyczne *in vitro*, użyto też hodowli tkankowych, jak i modeli bakteryjnych czy zwierzęcych. Należy jednocześnie zauważyć, że bezpośrednie porównanie działania otrzymanych antywitamin jako analogów witaminy B12, możliwe jest jedynie w odniesieniu do badań wykonanych na tych samych modelowych układach biologicznych. Obserwowane efekty antagonistyczne nie są więc uniwersalne i nie można np. ekstrapolować toksyczności antywitamin dla szczepu *O. malhamensis* do ludzkiego nowotworu mięsaka [1].

Antywitamina **grupy 1** pierwotnie testowano na aktywność antybakteryjną, a w ostatnich latach wśród tej grupy poszukiwano także skutecznych substancji antynowotworowych (rys. 6) [23, 27]. Najmniej liczne są analogi z **grupy 2**, a to z powodu pracochłonności syntezy w celu dokonania modyfikacji w obrębie pętli liganda α . Najciekawsze efekty uzyskano, wbudowując do pętli fragment *N*-2-aminoetyloglicynowy, stanowiący składową łańcuchów peptydowych kwasów nukleinowych (PNA), bądź w innym przypadku, wprowadzając resztę proliny [2, 28].



Rys. 6. Przykłady antywitamin B12 grupy 1 i 2

Warte wspomnienia są też odporne termicznie i metabolicznie arylokobalaminy należące do **grupy 3**: 4-etylofenylokobalamina EtPhCbl oraz 2-fenyletynylokobalamina PhEtyCbl (rys. 7) [4, 16]. Są one inhibitorami białek transportowych B12: czynnika wewnętrznego (IF), haptokoryny (HC) i transkobalaminy II (TCII), a także enzymu deligazy kobalaminy CblC, odpowiedzialnej za transformację kobalaminy do aktywnych metabolicznie kofaktorów MeCbl i AdoCbl. Wadą EtPhCbl w porównaniu z PhEtCbl jest wysoka wrażliwość na działanie światła, które powoduje rozkład analogu. Otrzymano również analogi witaminy B12, w których atom kobaltu wymieniono na rod (Rh) bądź iryd (Ir). Uzyskane w ten sposób metylorodobalamina (MeRhbl) oraz adenozylorodobalamina (AdoRhbl) hamowały wzrost komórek szpiku kostnego [29].



Rys. 7. Przykłady antywitamin B12 grupy 3

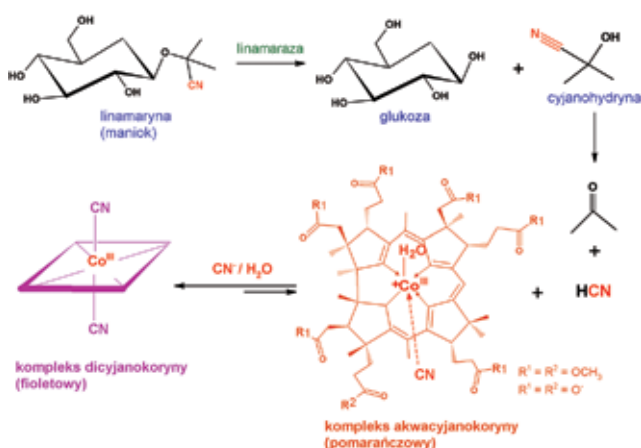
Najnowsze badania nad analogami witaminy B12 dotyczą ich potencjalnych zastosowań w toksykologii, w diagnostyce i terapii oraz w aktywacji enzymów, których deficyt prowadzi do różnych schorzeń. Poniżej zamieszczono skrótowy przegląd najnowszych osiągnięć w tej tematyce.

Analogi witaminy B12 do wykrywania i usuwania jonów CN^-

Odkryto, że akwakorynoidy mogą służyć jako detektory grupy nitrylowej ze względu na wysokie powinowactwo jonów cyjankowych do jonów kobaltu na +3 stopniu utlenienia. Z tego samego powodu mogą również pełnić rolę detoksykatorów [30, 31]. Mushett i in. w 1952 r. zademonstrowali skuteczność H_2OCbl jako antidotum w leczeniu zatruc cyjankami u myszy i odtąd akwakobalamina na stałe zagościła w lecznictwie [32]. Jest tolerowana w wysokich dawkach i nie wpływa na procesy natlenienia tkanek, choć z drugiej strony, ze względu na czerwoną barwę, zakłóca standardowe testy laboratoryjne określające



poziom bilirubiny, glukozy czy kreatyniny we krwi. Hassan i in. użyli estru metyloвого hydrocyjanokobalaminy do wykrywania jonów CN^- w ściekach przemysłowych [33]. W 2009 r. Maennel-Croise i Zelder wykazali, że stereochemia reakcji wiązania jonów CN^- jest kontrolowana zarówno przez atom metalu, jak i łańcuchy boczne makrocyclicznego układu korynowego oraz efekt indukcyjny liganda [34, 35]. Reakcję można śledzić gołym okiem, obserwując zmianę barwy od pomarańczowej do fioletowej już przy stężeniu $10 \mu\text{M}$ CN^- , czyli takim, które jest zbliżone do dopuszczalnego przez WHO stężenia CN^- w wodzie pitnej ($1,9 \mu\text{M}$). Zaproponowano także szybki test wykrywania jonów CN^- w układach biologicznych, w tym w manioku – głównym pożywieniu ludności w Afryce [36]. Maniok, zwłaszcza odmiana gorzka, zawiera cyjanoglikozyd – linamarynę, która na skutek hydrolitycznego rozkładu, zachodzącego w wyniku zniszczenia struktur komórkowych (np. pod wpływem rozcierania) wydziela toksyczny cyjanowodor. Glikozydem cyjanogennym jest również amygdalina znajdująca się w migdałach. Potraktowanie rozdrobnionych komórek roślinnych chemosensorem, bazującym na strukturze koryny, prowadzi do natychmiastowej reakcji barwnej – powstania fioletowego dicyjanokompleksu. Detekcja jonów CN^- z udziałem pochodnej witaminy B12 jest niezwykle czułą, szybką i łatwą w użyciu metodą. Sam test diagnostyczny otrzymał akronim ASSURED, od pierwszych liter określających go przymiotników *affordable, sensitive, selective, user-friendly, rapid, equipment-free, delivered*, czyli niedrogi, wrażliwy, selektywny, łatwy w obsłudze, szybki, niewymagający urządzeń i działający bezpośrednio na materiale biologicznym. Test można również stosować do oznaczania całkowitej ilości cyjanoków we krwi, łącznie z klasycznym testem mikrodyfuzji.

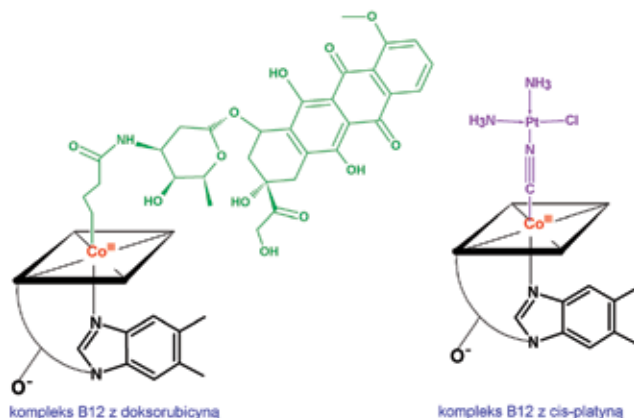


Rys. 8. Schemat hydrolizy linamaryny z manioku – reakcji prowadzącej do uwolnienia cyjanowodoru, którego szybka i łatwa detekcja możliwa jest z udziałem analogu B12

Analogi witaminy B12 w diagnostyce i terapii

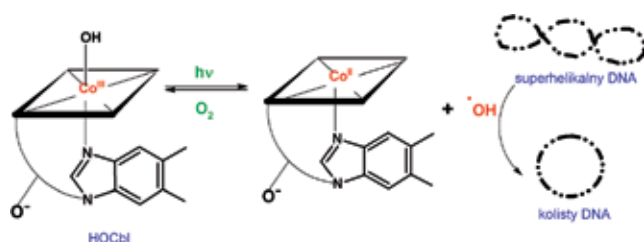
Wyrafinowany mechanizm wychwytu witaminy B12 przez komórki może być wykorzystany w diagnostyce i terapii zważywszy, że każda modyfikacja wpływa na proces oddziaływania z białkiem transportowym, co było też pierwotnym założeniem hipotezy „pułapki metylofolianowej” [15]. Uważnie dobrane i zaplanowane zmiany strukturalne, zwłaszcza w rejonie grupy 5'-OH pierścienia rybozy oraz atomu kobaltu, w obrębie których modyfikacje są najistotniejsze, powinny przynieść więc najlepsze efekty. Zaprojektowano wiele pochodnych B12 do dostarczania leków, radiofarmaceutyków, środków diagnostycznych, peptydów, hormonów czy markerów fluorescencyjnych [37-39]. Tak powstał np. biokoniugat cis-platyny i witaminy B12 o nieco obniżonej aktywności przeciwnowotworowej na skutek pogorszonego wchłaniania (rys. 9) [40]. Z kolei biokoniugat doksorubicyny (antracyklinowego antybiotyku cytostatycznego) i witaminy B12 wykazywał cytotoksyczność zależną od natężenia światła: w ciemności był nieaktywny, zaś pod wpływem wiązki światła o długości fali $\lambda = 530 \text{ nm}$ następował rozpad kompleksu i uwalnianie doksorubicyny o działaniu antynowotworowym [38]. Prowadzone są badania mające na celu tworzenie takich kompleksów, które na skutek fotoaktywacji uwalniałyby reaktywną cząsteczkę tylko w chorobowo zmienionym organie, dzięki czemu pozostałe zdrowe narządy nie byłyby narażone na uszkodzenia. Pozwoliłyby to także kontrolować czas działania leku, który w ciemności nie ulegałby aktywacji, dzięki czemu nie dochodziłoby do niepożądanego kumulacji biokoniugatów w wątrobie i nerkach.

Zaprojektowano również sondy luminescencyjne, bazujące na koniugacie kobalaminy z barwnikiem rodaminą, w celu wykorzystania jako śródoperacyjnych markerów komórek nowotworowych [41].



Rys. 9. Kompleksy witaminy B12 z lekami przeciwnowotworowymi: doksorubicyną i cis-platyną

Hydrokobalamina może służyć też jako fotokatalizator inicjujący przemianę kolistej superhelikalnej DNA do zrelaksowanej formy kolistej DNA (rys. 10) [42]. W tej reakcji HOcbI pod wpływem światła jest przekształcana do Cob(II) alminy i rodnika hydroksylowego, a indukowane światłem homolityczne rozszczepienie wiązania Co–C jest procesem dobrze poznanym. Wyższość wspomnianej strategii nad innymi metodami, wykorzystującymi np. kompleksy Fe²⁺ EDTA i H₂O₂, polega na łatwości w kontroli produkcji wolnych rodników poprzez proste włączenie i wyłączenie źródła światła. Ponadto strategia ta oferuje możliwość badania złożonych struktur wewnątrzkomórkowych przy zapewnieniu, że reakcja nie zostanie wygaszona przez kompetycyjne wiązanie innych biologicznych ligandów z katalitycznie aktywnym centrum kobaltu fotokatalizatora.

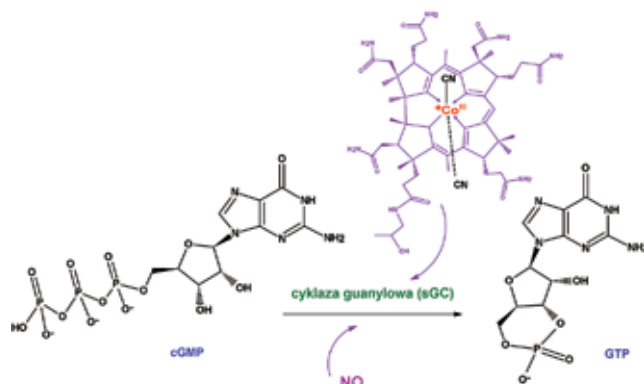


Rys. 10. Transformacja kolistej superhelikalnej DNA do zrelaksowanej formy kolistej DNA z udziałem hydrokobalaminy

Analogi witaminy B12 jako aktywatory enzymów

Martin i Gryko zaobserwowali, że amid dicyjanokobalaminy jest w stanie aktywować cyklazę guanylową (cGC), więc pochodne witaminy B12 mogą również znaleźć zastosowanie w terapii chorób wynikających z zakłóceń w ścieżce sygnałowej związanej z powstawaniem cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) [43-45]. cGMP powstaje z guanozynotrifosforanu (GTP) pod wpływem działania cyklazy guanylowej, który to enzym jest aktywowany przez tlenek azotu NO (rys. 11). Podwyższony cGMP może zainicjować szereg różnych procesów fizjologicznych takich jak rozluźnienie mięśni gładkich, rozszerzenie naczyń, hamowanie agregacji płytek krwi czy neurotransmisję. Z tego powodu leki uwalniające NO jak np. trinitrogliceryna odgrywają ważną rolę w zapobieganiu udarom i chorobom niedokrwiennym serca. Rozwój oporności wśród tej klasy związków stymuluje poszukiwania NO niezależnych aktywatorów.

Podsumowując, należy zauważyć, że w porównaniu z antyfolianami czyli antyvitaminami B9, pomimo wielu lat badań i ogromnego wysiłku, poszukiwania skutecznych antyvitamin B12 wciąż pozostają w fazie początkowej i trudno w obecnej chwili przewidzieć, kiedy i czy w ogóle powstaną



Rys. 11. Aktywacja cyklazy guanylowej przez dicyjanokobalaminy, warunkująca przekształcenie guanozynotrifosforanu (cGMP) w guanozynomonofosforan (GTP)

komercyjnie dostępne analogi B12 do medycznych zastosowań. Wobec pilnej potrzeby stworzenia nowych leków o alternatywnych sposobach działania, antyvitaminy B12 wydają się mieć ogromny potencjał, który tak naprawdę nie został jeszcze dostatecznie zbadany. Wspomnieć należy chociażby fakt, że ciągle na etapie postulatów pozostaje znaczenie samej witaminy B12 i jej szlaków metabolicznych w przebiegu wielu obecnie nieuleczalnych chorób cywilizacyjnych.

Literatura:

- [1] Zelder F., 2015, Recent trends in the development of vitamin B₁₂ derivatives for medicinal applications, Chem. Commun., 51, 14004-14017.
- [2] Zhou K., Oetterli R., Brandl H., Lyatuu F., Buckel W., Zelder F., 2012, Chemistry and bioactivity of an artificial adenosylpeptide B₁₂ cofactor, ChemBioChem, 13, 2052-2055.
- [3] Krautler B., 2015, Antivitamins B₁₂ – a structure- and reactivity-based concept, Chem. Eur. J., 21, 11280-11287.
- [4] Ruetz M., Salchner R., Wurst K., Fedosov S., Krautler B., 2013, Phenylethynylcobalamin: a light-stable and thermolysis-resistant organometallic vitamin B₁₂ derivative prepared by radical synthesis, Angew. Chem. Int. Ed., 52, 11406-11409; Angew. Chem. 2013, 125, 11617-11620.
- [5] Ruetz M., Gherasim C., Gruber K., Fedosov S., Banerjee R., Krautler B., 2013, Access to organometallic arylcobaltcorrins through radical synthesis: 4-ethylphenylcobalamin, a potential "antivitamin B₁₂", Angew. Chem. Int. Ed., 52, 2606-2610; Angew. Chem. 2013, 125, 2668-2672.
- [6] Giedyk M., Goliszewska K., Gryko D., 2015, Vitamin B₁₂ catalysed reactions, Chem. Soc. Rev., 44, 3391-3404.
- [7] o'Proinsias K., Giedyk M., Gryko D., 2013, Vitamin B₁₂: chemical modifications, Chem. Soc. Rev., 42, 6605-6619.
- [8] Hodgkin D. C., Kamper J., Mackay M., Pickworth J., Tru-blood K. N., White J. G., 1956, Structure of Vitamin B₁₂, Nature, 178, 64-66.
- [9] Folkers K., B 12, Vol. I (ed.: D. Dolphin), Wiley, New York 1982, pp. 1-15.



- [10] Nexø E., Vitamin B12 and B12-proteins (eds.: Krautler B., Arigoni D., Golding B. T.), Wiley-VCH, Weinheim 1998, pp. 461-475.
- [11] Andersen C. B. F., Madsen M., Storm T., Moestrup S. K., Andersen G. R., 2010, Structural basis for receptor recognition of vitamin-B₁₂-intrinsic factor complexes, *Nature*, 464, 445-448.
- [12] Banerjee R., 2006, B₁₂ Trafficking in Mammals: A Case for Coenzyme Escort Service, *ACS Chem. Biol.*, 1, 149-159.
- [13] Lerner-Ellis J. P., Tirone J. C., Pawelek P. D., Dore C., Atkinson J. L., Watkins D., Morel C. F., Fujiwara T. M., Moras E., Hosack A. R., Dunbar G. V., Antonicka H., Forgetta V., Dobson C. M., Leclerc D., Gravel R. A., Shoubridge E. A., Coulton J. W., Lepage P., Rommens J. M., Morgan K., Rosenblatt D. S., 2006, Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, CblC type, *Nature Genetics*, 38, 93-100.
- [14] Frey P. A., Hegeman A. D., *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York 2007.
- [15] Zelder F., Alberto R., *The Porphyrin Handbook*, Vol. 25 (eds.: Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R.), Elsevier Science San Diego 2012, pp. 83-130.
- [16] Mutti E., Ruetz M., Birn H., Krautler B., Nexø E., 2013, 4-Ethylphenyl-cobalamin impairs tissue uptake of vitamin B₁₂ and causes vitamin B₁₂ deficiency in mice, *Plos One*, 8, e75312. doi: 10.1371/journal.pone.0075312.
- [17] Reynolds E., 2006, Vitamin B12, folic acid, and the nervous system, *Lancet Neurol.*, 5, 949-960.
- [18] Zhang Y., Hodgson N. W., Trivedi M. S., Abdolmaleky H. M., Fournier M., Cuenod M., Do K. Q., Deth R. C., 2016, Decreased brain levels of vitamin B12 in aging, autism and schizophrenia, *PLoS ONE* 11, 1-19.
- [19] Drummond J. T., Matthews R. G., 1994, Nitrous oxide degradation by cobalamin-dependent methionine synthase: characterization of the reactants and products in the inactivation reaction, *Biochemistry*, 33, 3732-3741.
- [20] McLean G. R., Pathare P. M., Wilbur D. S., Morgan A. C., Woodhouse C. S., Schrader J. W., Ziltener H. J., 1997, Cobalamin analogues modulate the growth of leukemia cells in vitro, *Cancer Res.*, 57, 4015-4022.
- [21] Grim S. A., Rapp R. P., Martin C. A., Evans M. E., 2005, Trimethoprim-sulfamethoxazole as a viable treatment option for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pharmacotherapy*, 25, 253-264.
- [22] Klug G., 2014, Beyond catalysis: vitamin B12 as a cofactor in gene regulation, *Mol. Microbiol.*, 91, 635-640.
- [23] Friedrich W., *Vitamin B12 und Verwandte Corrinoid* (ed.: W. Friedrich), Thieme, Stuttgart 1975, pp. 81-87.
- [24] Hogenkamp H. P. C., Collins D. A., Grissom C. B., West F. G., *Chemistry and Biochemistry of B 12*, Wiley-Interscience, New York 1999.
- [25] Brown K. L., 2005, Chemistry and enzymology of vitamin B12, *Chem. Rev.*, 105, 2075-2149.
- [26] Gruber K., Puffer B., Krautler B., 2011, Vitamin B₁₂-derivatives – enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 4346-4363.
- [27] McLean G. R., Pathare P. M., Wilbur D. S., Morgan A. C., Woodhouse C. S., Schrader J. W., Ziltener H. J., 1997, Cobalamin analogues modulate the growth of leukemia cells in vitro, *Cancer Res.*, 57, 4015-4022.
- [28] Zhou K., Zelder F., 2010, Vitamin B12 mimics with a peptide backbone and tuneable coordination and redox properties, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 49, 5178-5180.
- [29] Carmel R., Koppenhagen V. B., 1977, The effect of rhodium and copper analogs of cobalamin on human cells in vitro, *Arch. Biochem. Biophys.*, 184, 135-140.
- [30] Cottrell J. E., Casthely P., Brodie J. D., Patel K., Klein A., Turndorf H., 1978, Prevention of nitroprusside-induced cyanide toxicity with hydroxocobalamin, *N. Engl. J. Med.*, 298, 809-811.
- [31] Shepherd G., Velez L. I., 2008, Role of hydroxocobalamin in acute cyanide poisoning, *Ann. Pharmacother.*, 42, 661-669.
- [32] Mushett C. W., Kelley K. L., Boxer G. E., Rickards J. C., 1952, Antidotal efficacy of vitamin B12a (hydroxo-cobalamin) in experimental cyanide poisoning, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81, 234-237.
- [33] Hassan S. S. M., Hamza M. S. A., Kelany A. E., 2007, A novel spectrophotometric method for batch and flow injection determination of cyanide in electroplating wastewater, *Talanta*, 71, 1088-1095.
- [34] Mannel-Croise C., Probst B., Zelder F., 2009, A straightforward method for the colorimetric detection of endogenous biological cyanide, *Anal. Chem.*, 81, 9493-9498.
- [35] Aebli B., Mannel-Croise C., Zelder F., 2014, Controlling binding dynamics of corrin-based chemosensors for cyanide, *Inorg. Chem.*, 53, 2516-2520.
- [36] Zelder F., Tivana L., 2015, Corrin-based chemosensors for the ASSURED detection of endogenous cyanide, *Org. Biomol. Chem.*, 13, 14-17.
- [37] Clardy S. M., Allis D. G., Fairchild T. J., Doyle R. P., 2011, Vitamin B₁₂ in drug delivery: breaking through the barriers to a B₁₂ bio-conjugate pharmaceutical, *Expert Opin. Drug Delivery*, 8, 127-140.
- [38] Petrus A. K., Fairchild T. J., Doyle R. P., 2009, Traveling the vitamin B₁₂ pathway: oral delivery of protein and peptide drugs, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 48, 1022-1028.
- [39] Shell T. A., Shell J. R., Rodgers Z. L., Lawrence D. S., 2014, Tunable visible and near IR photoactivation of light-responsive compounds, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 53, 875-878.
- [40] Mundwiler S., Spingler B., Kurz P., Kunzeand S., Alberto R., 2005, Cyanide-bridged vitamin B₁₂-cisplatin conjugates, *Chem.–Eur.J.*, 11, 4089-4095.
- [41] Lee M., Grissom C. B., 2009, Design, synthesis, and characterization of fluorescent cobalamin analogues with high quantum efficiencies, *Org. Lett.*, 11, 2499-2502.
- [42] Shell T. A., Lawrence D. S., 2011, A new trick (hydroxyl radical generation) for an old vitamin (B₁₂), *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 2148-2150.
- [43] Giedyk M., o'Proinsias K., Kurcon S., Sharina I., Martin E., Gryko D., 2014, Small alterations in cobinamide structure considerably influence sGC activation, *ChemMedChem*, 9, 2344-2350.
- [44] Sharina I., Sobolevsky M., Doursout M. F., Gryko D., Martin E., 2012, Cobinamides are novel coactivators of nitric oxide receptor that target soluble guanylyl cyclase catalytic domain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 340, 723-732.
- [45] Chrominski M., o'Proinsias K., Martin E., Gryko D., 2013, Protoporphyrin IX/Ccobyrinate derived hybrids – novel activators of soluble guanylyl cyclase, *Eur. J. Org. Chem.*, 1530-1537. ●