

KINETYCZNE ZMIANY W AKTYWNOŚCI HR-PEROKSYDAZY INDUKOWANE PRZEZ BARDZO NISKIE DAWKI FENOLU

*Poniższy tekst jest tłumaczeniem artykułu
zamieszczonego w International Journal of High Dilution Research,
v.7, issue 23, p.311, June 2008, ©2008 GIRI*

Streszczenie

Allosteryczne białko peroksydazy chrzanowej (HRP) wykazuje dwa główne typy aktywności: peroksydazową (zależną od obecności nadtlenu wodoru) i oksydazową (zależną od ilości tlenu), które determinują wpływ niskocząsteczkowych efektorów. Testowano działanie bardzo wysokich rozcieńczeń fenolu na aktywność HRP w oparciu o metody kolorymetryczne i luminometryczne. Rozcieńczenia fenolu sporządzano w wyniku systematycznego rozcieńczania fenolu w 75% etanolu. Wyniki wskazały, że wysokie rozcieńczenia fenolu, również te poniżej wartości stałej Avogadro, mogą aktywować lub hamować aktywność HRP zarówno w reakcji oksydazowej, jak i peroksydazowej, zgodnie z przebiegiem sinusoidy. Wartość stałej Michaelisa (K_m) mierzona wobec substratów peroksydazy, o-dianizydyny i H_2O_2 , zmieniała się zgodnie z tymi dwoma typami aktywności; maksimum aktywności peroksydazowej odpowiadało minimum aktywności oksydazowej i odwrotnie. Efekt ten zależał także od rodzaju rozcieńczalnika. Obserwacje oscylacji badanych aktywności, zależnych od stopnia rozcieńczenia fenolu i czasu wspólnego oddziaływania z enzymem, prowadzą do wniosku, że HRP może być dobrym modelem dla badania wpływu wysokich rozcieńczeń na struktury biologicznie aktywne. Eksperymenty dowiodły, że HR-peroksydaza jest bardzo wrażliwym detektorem subtelnych zmian w stężeniu fenolu, spełniającego rolę kofaktora w reakcji peroksydazowo-oksydazowej.

Słowa kluczowe: HR-peroksydaza, reakcja P-O, fenol, hormeza, homeopatia, wysokie rozcieńczenia.

Wstęp

W komórkach żywych organizmów metabolizm tlenowy jest ściśle związany z obecnością nadtlenu wodoru (H_2O_2), cząsteczki, która gra zasadniczą rolę w detoksykacji środowiska i funkcjonuje jako łącznik pomiędzy katabolizmem i anabolizmem (1). Ta mała cząsteczka jest bardzo ruchliwa i łatwo przenika biologiczne błony. Regulacja przepuszczalności błon wobec różnych rodników tlenowych może służyć ochronie przed stresem tlenowym (2). Jak wykazali Antunes i Cadenas (3), submikromolarnie ilości nadtlenu wodoru są istotne dla indukcji subtelnych biochemicznych zdarzeń, takich jak na przykład procesy apoptotyczne. Jednak, pomimo dużej empirycznej wiedzy na temat istotnej roli tej cząsteczki

w życiu komórki, molekularny metabolizm H_2O_2 jest nadal dyskutowany. Peroksydazy należą do najsilniejszych destruktorów nadtlenu wodoru. Są one egzoenzymami z grupy oksydoreduktaz, katalizujących utlenianie różnych fenolowych aromatów przez nadtlenek wodoru w obecności tlenu (4). Różnicowanie peroksydaz odbywa się na podstawie rodzaju substancji fenolowej, zastosowanej jako substrat. W materiale roślinnym i grzybowym występuje kilka rodzajów tych enzymów (5), ale najpowszechniejsza jest peroksydaza izolowana z chrzanu (HR-peroksydaza). Wg klasyfikacji międzynarodowej występuje ona pod numerem E.C.1.11.1.7 i katalizuje tlenowe przekształcenia fenoli i aminofenoli w obecności nadtlenu wodoru (6). Jej potencjał utleniająco-redukujący pary jonów żelaza $Fe(III)/Fe(II)$ w

centrum aktywnym jest najniższy spośród enzymów o funkcji peroksydazowej, takich jak peroksydaza ligninowa, peroksydaza cytochromu C, czy peroksydaza manganu-zależna (7). HR-peroksydaza współpracuje z innymi zespołami enzymatycznymi o funkcjach antystresowych i antyutleniających, takich jak dysmutaza nadnadtlenkowa, oksydaza NADH, oksydaza glukozy, laktaza i wiele innych, które są konkurencyjne względem fenolowych substratów. Taka wieloskładnikowa detoksykacja, obejmująca rozkład nadtlenku wodoru i naturalnych fenoli, może mieć znaczenie praktyczne (8).

Ujawnienie podwójnej katalitycznej roli peroksydazy, opisanej w detalach przez Bronniková, Olsena i Schaffera (9, 10), pomogło rozpoznać oscylacyjny charakter reakcji peroksydazowo-tlenowej (PO). Zgodnie z Hauserem i wsp. (6) oraz Olsenem i wsp. (11), reakcje te wykazują naturę biologicznego oscylatora i mogą być modyfikowane przez różne metaboliczne współsubstraty (12). Wśród takich aktywatorów ułatwiających oscylacje typu PO wyróżniają się zwłaszcza ważne biologicznie związki aromatyczne. Są to pochodne kwasu p-hydroksybenzoesowego, naturalne i syntetyczne substancje fenolowe (np. leki) (13), pochodne tryptofanu, w tym również melatonina, czyli hormon szyszynki u kręgowców, silnie związana z funkcjonowaniem rytmów dobowych i sezonowych u zwierząt i ludzi. Wszystkie te związki są rozpoznawane jako substraty dla jedno-elektronowej redukcji, katalizowanej przez HRP (14,15). Wśród wielu substratów zwłaszcza gwajakol i orto-dianizydyna są najczęściej stosowane w testach kolorymetrycznych do wykrywania obecności HRP (16), a także grają rolę w ochronie centrum aktywnego tego enzymu (13). Inni autorzy, wśród nich Nicell i Wright (17) oraz Walderrama i wsp. (5) podkreślają, że nawet katalityczne ilości nadtlenku wodoru mogą wtórnie hamować wszystkie rodzaje peroksydaz i innych ważnych hemoprotein. Są znane także inne biologicznie aktywne substancje, jak kwas askorbiny (12), które grają pozytywną rolę w regulacji oscylacji typu PO, ochraniając enzym przed szkodliwym działaniem tlenu.

Taurog i inni (18) donieśli o małych ilościach fenoli, obecnych w środowisku reakcji, które były zdolne do zmiany katalitycznych aktywności peroksydaz, co ujawniało się jako zmiana w długości absorbowanej fali światła. Autorzy wykazali, że katechol zmieniał kolor mieszaniny reakcyjnej z brązowego na niebieski w wyniku tworzenia się bifenochinonu podczas rutynowej reakcji z gwa-

jakołem. Doegre i wsp. (16) badali dokładnie mechanizm takich reakcji i stwierdzili, że końcowy kolor powstający podczas reakcji peroksydazy z fenolowymi substratami jest determinowany przez fenolowe rodniki tlenowe. Inna aromatyczna substancja, luminol (3-amino-ftalohydrazyd), także okazała się przydatna w oznaczaniu aktywności HR-peroksydazy metodami luminescencyjnymi, które wykorzystują efekt pojawiania się dwuanionowych rodników, związanych z ekscytacją światła. Niektóre pochodne fenolowe, jak para-jodofenol, kwas para-kumarowy, fenol czy anilina, podwyższają efekt luminescencji w reakcji luminalu z HR-peroksydazą (19).

W naszej wcześniejszej pracy przedstawiliśmy wyniki oznaczeń kolorymetrycznych wykazujące zmiany oscylacyjne w aktywności peroksydazowej w obecności wysoko rozcieńczonych wybranych związków fenolowych w eksperymentach z grzybnia grzybów, hodowanych w laboratorium lub z czystymi enzymami (20, 21). Analizując działanie 19 różnych substancji fenolowych, które poddano szeregom rozcieńczeń, na aktywność czystej HR-peroksydazy, zaobserwowaliśmy indywidualny wzór oscylacji dla poszczególnych związków fenolowych, jeśli enzym pozostawał przez kilka godzin pod działaniem tych rozcieńczeń. Wśród otrzymanych wzorców oscylacyjnych, rozcieńczenia fenolu oraz kwasów i aldehydów wanilinowych (wszystkie wymienione związki aromatyczne posiadają jedną grupę -OH – red.) produkowały bardzo symetryczne sinusoidalne krzywe, których maksima i minima pojawiały się w analogicznych przedziałach rozcieńczeń, co podlegało matematycznej weryfikacji (21). Wyniki te otrzymano stosując prosty test kolorymetryczny oznaczania aktywności HRP z orto-dianizydyną i nadnadtlenkiem wodoru jako współsubstratami. Skłoniły nas one do prowadzenia dalszych badań nad wpływem kolejnych rozcieńczeń fenolu na aktywność czystej HR-peroksydazy, przy zastosowaniu zarówno metod kolorymetrycznych, jak i luminescencyjnych.

Materiały i metody

Materiały

Wszystkie oznaczenia były prowadzone z wykorzystaniem handlowo dostępnej HR-peroksydazy o wskaźniku aktywności $RZ=3$ ($RZ=A_{403}/A_{275nm}$), zakupionej w firmie SIGMA. Roztwór wyjściowy przygotowano w 0,1 M buforze octanowym, pH 5.5, i przechowywano w

temp -10°C . Przed użyciem roztwór ten rozcieńczano do $\text{RZ}=2$. Fenol o wysokiej czystości pochodził z firmy Loba-Chemie, Wiedeń, Austria, i był redestylowany przed użyciem.

Sporządzanie rozcieńczeń fenolu i rozcieńczalników

Kolejne rozcieńczenia fenolu przygotowywano w 75% etanolu lub, porównawczo, w wodzie destylowanej, w 31 seryjnych iteracjach (krokach), jak to opisano w poprzedniej pracy (21). Wyjściowe stężenie fenolu wynosiło 1 mol/l i podlegało kolejnym rozcieńczeniom w stosunku 1:100. W postępowaniu rutynowym 10 ul wyjściowego roztworu przenoszono do 990 ul rozcieńczalnika i wstrząsano ręcznie 10x w ruchu pionowym (22, 23). Otrzymany roztwór Ph 1 (pierwszy setny roztwór fenolu; ang. phenol) był rozcieńczany tak jak poprzednio. Roztwór Ph 2 rozcieńczano do Ph 3 i tak postępowano kolejno aż do uzyskania rozcieńczenia Ph 31. Dla kontroli podobne postępowanie przeprowadzono dla 75% alkoholu oraz wody destylowanej jako roztworów wyjściowych. Ostatecznie otrzymano 4 szeregi rozcieńczeń: dwa dla fenolu, oznaczone jako Pha (alkohol) i Phw (woda) oraz po jednym dla destylowanej wody (W) oraz 75% etanolu (A), wszystkie sporządzone w tych samych warunkach laboratoryjnych.

Wstępna inkubacja HRP z rozcieńczeniami fenolu, etanolu i wody

Procedura inkubacji była analogiczna dla wszystkich czterech serii rozcieńczeń. Standardowo dwa mililitry roztworu HRP mieszano z 200 ul odpowiedniego rozcieńczenia i po 4 godzinach (maksymalnie po 24, w zależności od czasu trwania eksperymentu) oznaczano aktywność enzymu metodą kolorymetryczną lub luminometrycznie.

Oznaczanie aktywności HRP

Pomiar spektrofotometryczny

Wykorzystanie metody kolorymetrycznej z orto-dianizydyną jako donorem protonów (24) zostało opisane w poprzednich pracach (20, 21). Pomiar spektrofotometryczny prowadzono na aparacie Varian Cary 2 przy 469 nm w 25°C . Mieszanina reakcyjna zawierała 0.2 ml próby, 2.8 ml buforu octanowego (pH 5.5), 3 mmole H_2O_2 i 12 mmoli orto-dianizydyny. Aktywność wyrażano

w nkatalach w przeliczeniu na litr na podstawie oznaczonego doświadczalnie współczynnika absorbancji.

Pomiar luminometryczny

Mieszanina reakcyjna składała się z 0.5 ml badanej próby HRP (po inkubacji z odpowiednimi rozcieńczeniami fenolu lub rozcieńczalnika), 0.5 ml wody destylowanej, 100 ul roztworu luminolu (1.5 mmoli) i 50 ul H_2O_2 (3 mmole). Pomiary prowadzono w temp 25°C bezpośrednio po dodaniu nadtlenu wodoru. Chemoluminescencja była mierzona co 10 sec. w aparacie Lumat LB 9507 (Berthold Technologies). Wyniki uśredniano z 3 powtórzeń. Ponieważ standardowe odchylenie (SD) zazwyczaj nie przekraczało 200 jednostek RLU, nie zostało uwidocznione na wykresach. Dla adjustacji kształtu sinusoidy na krzywych eksperymentalnych przeprowadzono rekalkulację z wykorzystaniem parametrów równania $y = y_0 + A \cos(\beta n - \gamma)$ (kiedy n jest liczbą iteracji) z algorytmem Levenberga-Marquardta w metodzie najmniejszych kwadratów (25) zgodnie z poprzednim opisem (21).

Kinetyka i oznaczenia stałej K_m

Zależności kinetyczne dla HRP określono po 4 godz. inkubacji z 6 rozcieńczeniami fenolu, wybranymi z serii Pha na podstawie pomiarów kolorymetrycznych wobec wzrastających stężeń obu substratów, orto-dianizydyny i H_2O_2 . Wyniki, wyrażone w μmol ach wartości stałej K_m , były skalkulowane na podstawie krzywej Michaelisa-Menten wyrażonych liniowo na wykresie wg Lineweavera-Burka gdzie [S] wskazywało stężenie substratu a V szybkość reakcji.

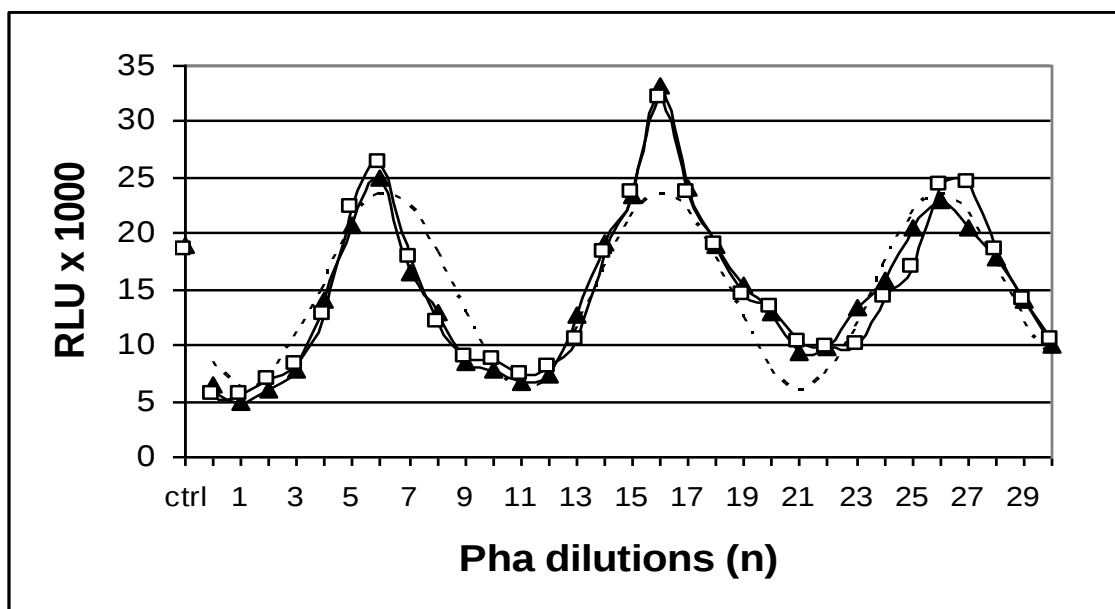
Wyniki

I. Zmiany w aktywności HRP w obecności wysokich rozcieńczeń fenolu w 75% etanolu

Aktywność HRP, preinkubowanej z dwoma równoległymi seriami rozcieńczeń fenolowych w 75% etanolu (seria Pha), była mierzona luminometrycznie. Zestawienie danych ujawniło krzywą sinusoidalną wraz z 3 wyraźnymi punktami maksimum i 3 punktami minimum (rys. 1). Należy podkreślić, że zmiany w aktywności pojawiały się po 4-godzinnej inkubacji ze stopniowo malejącymi rozcieńczeniami fenolu. Analogiczne wyniki uzyskano wcześniej w pomiarach kolorymetrycznych (21). Wartości maksymalnej zwyżki lub obniżenia aktywności pojawiały się w regular-

nych odstępach pomiędzy badanymi rozcieńczeniami fenolu, co odpowiada 10 iteracjom (w skali setnej odpowiada to 20 zerom po przecinku). W oparciu o dane eksperymentalne wytypowano trzy wartości rozcieńczeń, które powodowały najwięk-

sze obniżenie aktywności i odpowiadały rozcieńczeniom Pha 1, 11, 21 i 31, oraz trzy związane z maksymalnym podwyższeniem aktywności – Pha 6, 16, 26.

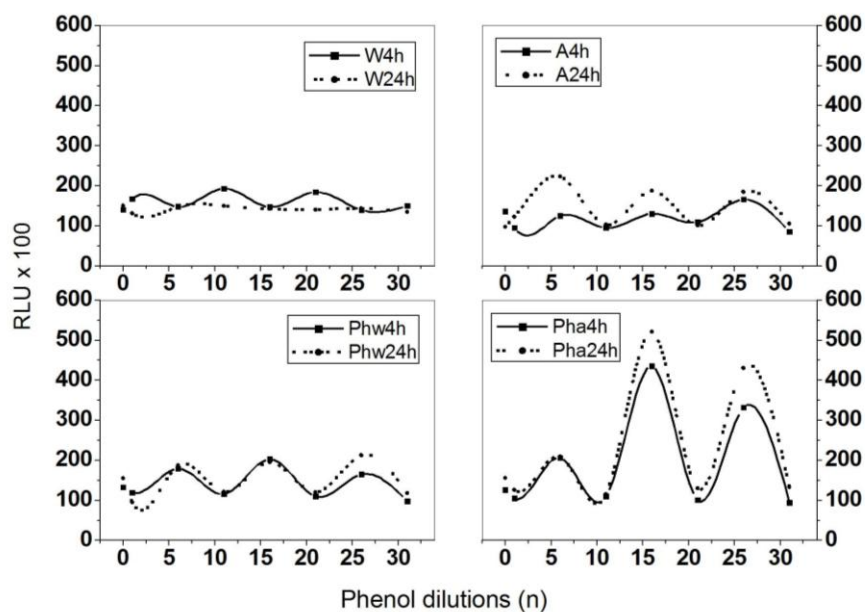


Rys. 1. Zmiany w aktywności HRP po 4-godzinnej inkubacji z rozcieńczeniami fenolu z dwu niezależnych serii Pha. Pomiar luminometryczny, wartość kontrolna 17×10^3 RLU; linia przerywana odpowiada graficznej ilustracji teoretycznego równania (opis w Materiałach i Metodach).

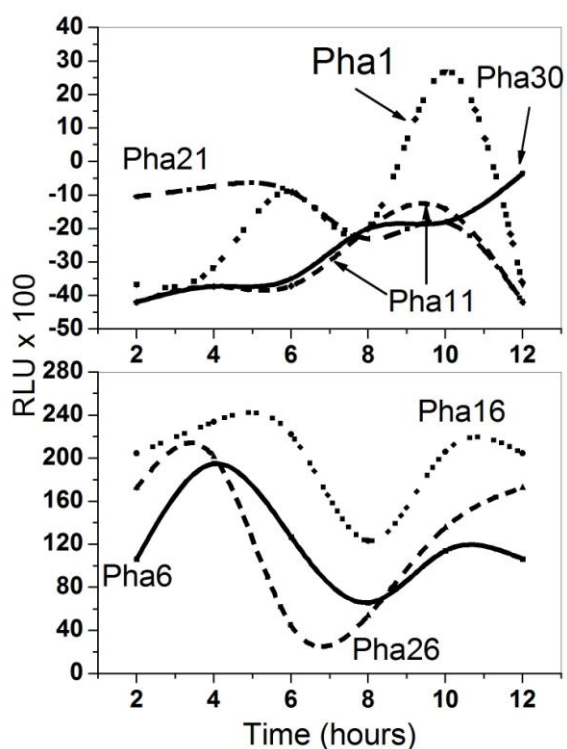
Numeryczne dostosowanie teoretycznego 4-parametrycznego równania do danych eksperymentalnych pozwoliło na określenie wartości odpowiednich współczynników jako $y_0 = 15 \times 10^3$; $A = 9,0 \times 10^3$; β (beta) = $2\pi/10$; γ (gamma) = 3,8. Wartość eksperymentalnego współczynnika y_0 jest porównywalna z wartością kontrolną 17×10^3 [RLU], podczas gdy amplituda A reprezentuje efekt oscylacyjny, indukowany przez rozcieńczenia Pha. Wartość β opisuje odległość między iteracjami w szeregu rozcieńczeń, a γ jest przesunięciem fazowym, przypuszczalnie wynikającym z samej natury fenolu, ale nie do końca zrozumiałym, tak jak i wartości minimum aktywności (5×10^3 RLU), przypuszczalnie również związane z właściwościami rozcieńczalnika w odpowiedzi na jego własną dynamikę lub pewną ilość gazu rozpuszczonego podczas rozcieńczania.

II. Wpływ rodzaju rozcieńczalnika na zmiany w aktywności HRP

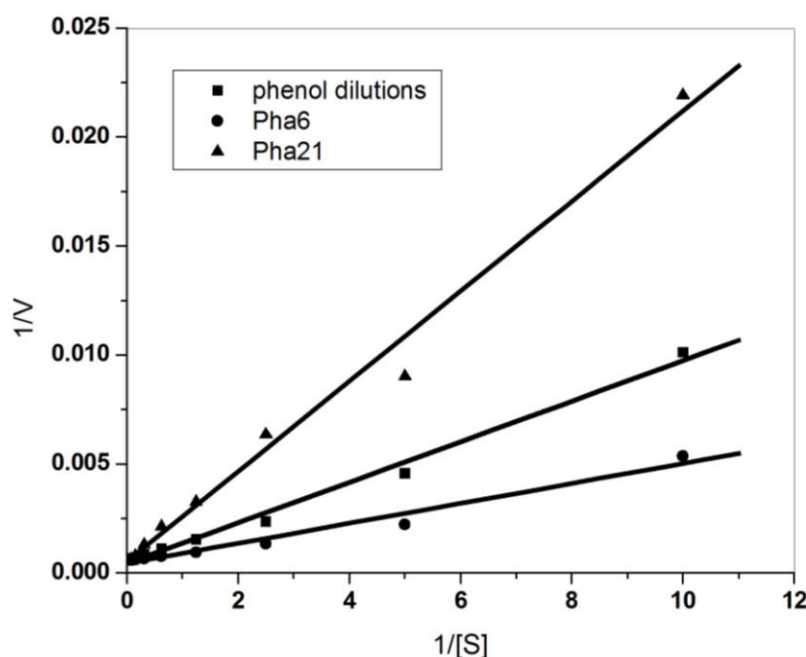
Kolejne eksperymenty ujawniły podczas pomiarów luminometrycznych wyraźne różnice w reakcji dla 7 wybranych rozcieńczeń fenolu w zależności od zastosowanego rozcieńczalnika. Należy podkreślić, że seria rozcieńczeń w wodzie (Phw) wywoływała znacznie mniejsze efekty niż seria etanolowa, zarówno po 4, jak i 24 godzinach inkubacji. Oddziaływanie kontrolnych rozcieńczeń samej wody było bardzo niskie po 4 godzinach i zanikało po 24 godzinach inkubacji z HRP. Porównawczo seria etanolowa wykazywała w tym czasie tendencje wzrostową. Porównanie wszystkich uzyskanych danych eksperymentalnych zobrazowano na rys. 2. Wyniki podkreślają właściwość wyboru 75% etanolu dla przygotowania rozcieńczeń fenolu, ponieważ wydaje się ułatwiać stabilizację badanego efektu.



Rys. 2. Porównanie pomiędzy 4 wariantami po 4 i 24 godzinach inkubacji HRP z wybranymi rozcieńczeniami. A = seria kontrolna alkoholu, Pha – rozcieńczenia fenolu w 75% etanolu, W = seria kontrolna wody, Phw – rozcieńczenia fenolu w wodzie. Pomiar luminometryczny.



Rys. 3. Czasowe zależności pomiędzy 7 wybranymi rozcieńczeniami serii Pha, po inkubacji z HRP podczas 12 godzin. Pomiar luminometryczny.



Rys. 4. Wykres Lineweavera-Burka dla HR-peroksydazy inkubowanej z wybranymi etanolowymi rozcieńczeniami fenolu; kwadraty – kontrola, kółka – Pha 6 (aktywacja), trójkąty – Pha 21 (inhibicja); V – szybkość reakcji w nkatalach/litr, [S] – stężenie substratu (umole orto-dianizydyny). Pomiar kolorymetryczny.

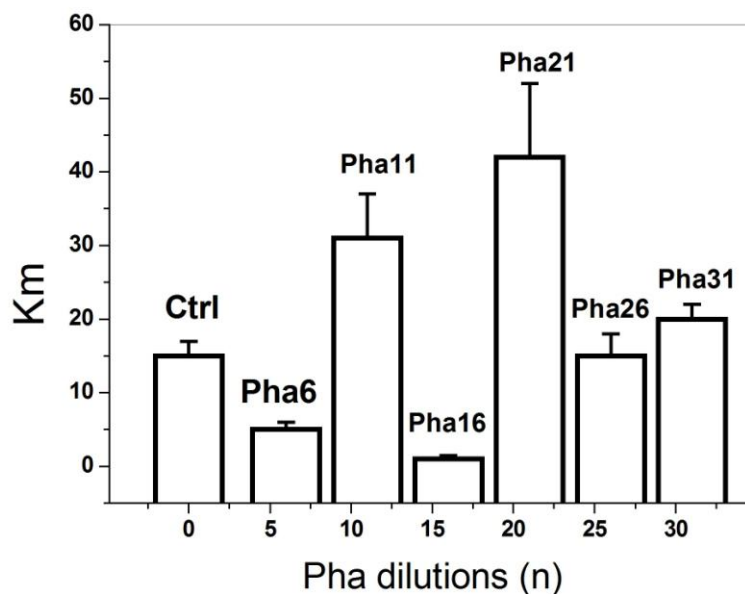
III. Obserwacje działania wysokich rozcieńczeń fenolu na HRP w czasie

Zmiany w aktywności HRP podczas 12-godzinnej inkubacji z wybranymi rozcieńczeniami fenolu, odpowiadających za ekstremalne zmiany aktywności, badano w teście luminometrycznym. Aktywność była mierzona co 2 godziny bez dodawania nowych porcji rozcieńczeń fenolowych. Zauważono pojawianie się dwu maksimów aktywności po 4 i po 12 godzinach i jedno minimum po 8 godzinach inkubacji dla rozcieńczeń Pha 6, 16, i 26 (rys. 3). Najniższa aktywność była obserwowana dla rozcieńczeń Pha 1, 11, 21 i 31, które stawały się niższe niż wartość kontrolna. Wykresy wykazały zróżnicowaną dynamikę zmian aktywności HRP, która była zależna od stopnia rozcieńczenia fenolu i czasu pre-inkubacji.

IV. Wartości K_m

Dla poszczególnych rozcieńczeń wybranych z serii Pha zależności kinetyczne wg krzywej Mi-

chaelisa-Menten określone były w pomiarze kolorymetrycznym wobec różnego stężenia substratów, orto-dianizydyny jako donora protonów i H_2O_2 . Do porównania wybrano rozcieńczenia Pha 6, Pha 21 i kontroli, co zostało przedstawione na rys. 4. Te 3 linie uzyskano z przekształcenia hiperbolicznego wykresu Michaelisa-Menten zgodnie z wykresem odwrotności tych wartości wg Linewearea-Burka. Uzyskano 3 różne lokalizacje porównywanych krzywych, gdzie na rys. 4 linia dla Pha 6 umieszczona jest pod linią kontroli, co wskazuje aktywacyjny charakter czynnika, w porównaniu do linii Pha21, która wskazuje na hamowanie procesu. Wartość K_m była obliczona dla wszystkich wykresów kinetycznych (rys. 5), przy czym niskie wartości K_m odpowiadają aktywacji HRP i to działanie potwierdzono dla rozcieńczeń Pha 6, 16 i 26. Wysokie wartości K_m wskazywały rozcieńczenia o charakterze zmniejszającym aktywność HRP i odnosiły się do frakcji Pha 11, 21 i 31.

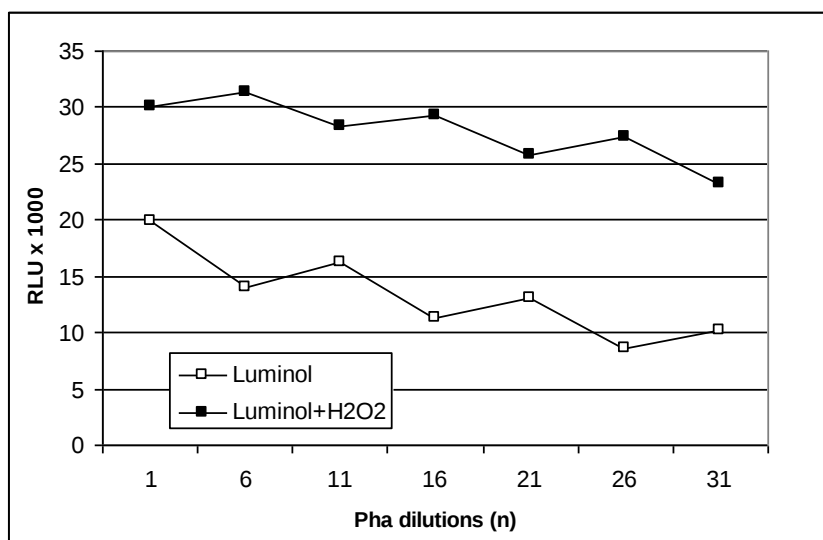


Rys. 5. Wartości Km (umole) dla HRP, inkubowanej przez 4 godziny z wybranymi rozcieńczeniami serii Pha. Ctrl – kontrola z 75% etanolu. Pomiar kolorymetryczny.

V. Wpływ nadtlenku wodoru na aktywność HRP

Podczas pomiarów luminescencyjnych prowadzono dwa równoległe oznaczenia w celu określenia wpływu obecności H_2O_2 na poziom lumi-

nescencji. W tym celu HRP inkubowano z rozcieńczeniami Pha 6, 16 i 26 oraz 1, 11, 21, a potem dokonywano pomiarów w obecności H_2O_2 lub bez niej (rys. 6).



Rys. 6. Wpływ obecności H_2O_2 (3 mM) na wynik pomiaru luminometrycznego aktywności HRP po 4 godzinach inkubacji z odpowiednimi rozcieńczeniami serii Pha; białe kwadraty – sam luminal, czarne kwadraty – luminal i H_2O_2 .

Dyskusja

Podczas inkubacji HRP z roztworami fenolu w wodzie lub 75% etanolu dają się zauważyć znaczne różnice w aktywności tego enzymu. Zmiany w kinetyce działania enzymu ilustrował regularny sinusoidalny kształt krzywej o charakterze oscylującym pomiędzy ekstremami – minimum i maksimum aktywności, w porównaniu z wartością kontrolną.

Wybór HRP do powyższych badań, jako enzymu współpracującego z dwoma substratami, z których jeden gra rolę donora, a drugi akceptora protonów, został podyktowany powszechnym występowaniem tego enzymu w przyrodzie. Ponadto wykazuje on wyraźne zróżnicowanie pod względem pracy w warunkach tlenowych i w obecności nadtlenu wodoru, znanych jako reakcje peroksydazowo-tlenowe (11). Substancje fenolowe, wśród nich także sam fenol, są rozpoznane jako naturalne czynniki indukujące zjawiska oscylacyjne w układzie zespołu reakcji PO (6). Fenol należy do kategorii peroksydazowych ko-substratów, które podwyższają emisję światła w systemie luminal- H_2O_2 -HRP (19). Dodatkowo, fenol jest produkowany w naturalnym środowisku w wyniku biodegradacji naturalnych substancji aromatycznych i jest powszechny na terenach o wysokim skażeniu chemicznym.

Kluczowym czynnikiem w modyfikacji aktywności peroksydazowej przez wysokie rozcieńczenia fenolu wydaje się być aktywacja tych ostatnich przez wytrząsanie podczas procedury dynamicznego rozcieńczania (26). Kiedy rozcieńczenia te były pre-inkubowane z enzymem, uzyskano symetryczne sinusoidy w odróżnieniu od liniowych zależności, na jakie można było być przygotowanym przy stopniowym rozcieńczaniu fenolu przy założeniu, że wchodzi on w reakcję z enzymem jako kofaktor. Teoretycznie po przekroczeniu wartości stałej Avogadro nie należało się spodziewać żadnych zmian w aktywności. Jednak regularność pojawiania się ekstremalnych wartości, wskazujących na oscylacje pomiędzy minimum i maksimum aktywności HRP pod wpływem określonych rozcieńczeń fenolu, każe zweryfikować naszą dotychczasową wiedzę odnośnie odpowiedzi enzymu na zróżnicowane progi rozcieńczenia. W licznych pracach Elia i wsp. (22, 23) wykazali, że występują wyraźne różnice w oznaczeniach kolorymetrycznych wysoko rozcieńczonych kwasów, zasad i soli, które były aktywowane przez ręczne lub mechaniczne wstrząsanie, w

porównaniu z roztworami pozbawionymi tego zabiegu. Z drugiej strony, nie obserwowano w tych oznaczeniach zadanych krzywych sinusoidalnych ani dynamicznie oscylujących. To wskazuje na unikalność modelu biologicznego, który wykorzystuje półprzewodnikowe właściwości białek i innych naturalnych biopolimerów i może służyć jako detektor finezyjnych zmian w kinetyce molekularnej. Oscylacyjne zmiany w aktywności HRP mogą być interpretowane w zgodzie ze zjawiskiem hormezy jako pozytywne lub negatywne stany kinetycznej ponadkompensacji, zgodnie z propozycją Calabrese (27, 28). Regularne wzorce zmian w aktywności HRP, obserwowane przez nas, prowadzą do wniosku, że rozcieńczenia fenolu wywierają wpływ na molekularne struktury centrum aktywnego tego enzymu, powodując energetycznie niestabilne zaburzenia w relacjach międzyatomowych, widziane jako okresowe zmiany we współdziałaniu pomiędzy enzymem i substratem.

W poprzedniej pracy donosiliśmy, że różne fenolowe substancje indukują powstawanie odrębnych wzorców krzywych, kiedy HRP jest inkubowana z tymi substancjami, i w ten sposób enzym ten może wykrywać chemiczne różnice między kofaktorami (21). Ta obserwacja dotyczyła 19 fenolowych ko-substratów peroksydazy i pozostawała w zgodzie z faktem, że cząsteczki miały różny skład molekularny. Stanowiło to podstawę do zróżnicowania poszczególnych rodzajów cząsteczek na podstawie charakterystyki ich częstotliwości, badanych techniką rezonansową.

Fala dynamicznego rozcieńczania fenolu, wykrywana przez HRP, była kształtem bardzo podobna do częstotliwości wanilinianów i izowanilinianów, z których każdy posiada po jednej grupie OH. Opisanie fal rozcieńczania różnych efektorów może w przyszłości stać się nowym analitycznym instrumentem w studiowaniu kinetyki współpracujących z nimi enzymów. W naszych doświadczeniach częstotliwość oscylacyjna dla fenolu, wykrywana przez HRP, odpowiadała liczbie dziesięciu kolejnych przeniesień.

Bardzo podobny efekt oscylacji, taki jak dla relacji fenol-HRP, został otrzymany przez grupę francuską – i opisany w artykule Belona (29) – dla degranulacji bazofili, hamowanej przez progresywne rozcieńczenia histaminy. Wiele innych studiów nad bimodalnym charakterem odpowiedzi enzymatycznej na obecność różnych rozcieńczeń efektorów jest wymienionych w pracy prze-

glądowej Witt i wsp. (30); wśród nich liczne prace Dittmanna i Hirscha (31, 32, 33). Jednak efekt sinusoidalnych zmian w aktywności enzymatycznej w odpowiedzi na systematyczną progresję rozcieńczania różnych testowanych efektorów nie jest dyskutowany w tych pracach.

Warto podkreślić, że przedstawione tutaj zmiany w aktywności HRP są w wysokim stopniu powtarzalne i łatwe do zmierzenia konwencjonalnymi metodami analitycznymi, spektralnymi i luminometrycznymi. W naturze peroksydaza gra rolę naturalnego biologicznego oscylatora (11), gdzie aktywność enzymatyczna oscyluje pomiędzy dwoma ekstremalnymi punktami na krzywej sinusoidalnej. Było to także widoczne w przedstawionych eksperymentach, kiedy peroksydaza była inkubowana z postępującymi rozcieńczeniami fenolu. Podczas tych sinusoidalnych zmian wysoka energia kinetyczna wydaje się korespondować z wysoką peroksydazową aktywnością, a wysoka energia potencjalna zdaje się towarzyszyć wysokiej aktywności oksydazowej.

Olsen i inni (11) sugerują, że ochrona enzymu peroksydazy za pomocą nadtlenu wodoru przeciwko toksycznemu działaniu tlenu jest skorelowana z poziomem rodników peroksydazowych. Możliwe, że dynamiczne rozcieńczenia fenolu jako ko-substratu trzymają te wolne rodniki w równowadze, która ułatwia ochronę centrum aktywnego HRP (13, 17) przez fenolowe substraty (luminal, orto-dianizydyna). W rezultacie naszych eksperymentów w serii Pha okazało się, że etanol jako rozcieńczalnik może stabilizować tę równowagę lepiej niż czysta woda.

Pomimo braku pełnego wyjaśnienia opisanych zależności i zjawiska hormezy w ogólności, unikalne właściwości HR-peroksydazy i innych białek enzymatycznych (20, 21, 34) jako detektorów ultrawysokich rozcieńczeń własnych ko-substratów zostały wykazane eksperymentalnie.

Obecne rezultaty są porównywalne z wynikami innych autorów, którzy studiowali podobne biologiczne zjawiska z enzymami grającymi kluczową rolę biologiczną (30). „Fale” dynamicznego rozcieńczania efektorów, mierzone jako zmiany w enzymatycznej aktywności HRP, mają powtarzalny charakter i są mierzalne za pomocą fizykochemicznych metod, takich jak spektrofotometria, luminometria czy elektroforeza (prace w przygotowaniu). W przyszłości studia nad zmianami enzymatycznej kinetyki pod wpływem wysokich rozcieńczeń mogą zostać zakwalifikowane do grupy badań, tworzących nową gałąź wiedzy,

obejmującą żywe komórki, białka czy kwasy nukleinowe. Ta nowa wiedza może znaleźć zastosowanie w ochronie środowiska i przyczynić się do znacznego zmniejszenia zapotrzebowania na chemiczne środki stosowane w celu ochrony zdrowia, roślin, chemii żywności i ogólnie w biotechnologii (35, 36).

Podziękowanie

Autorka serdecznie dziękuje *Pani dr Janinie Rodakiewicz-Nowak* za Jej cenne uwagi i inspirujące dyskusje oraz *Pani mgr Janinie Kochmańskiej-Rdest* za wspaniałą pomoc techniczną. Praca została wykonana w ramach Projektu Badawczego BW/UMCS 2007.

Elżbieta Malarczyk

malar@poczta.umcs.lublin.pl

Piśmiennictwo:

1. Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW. 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 2003;14: 211-215.
2. SousaLopes A, Antunes L, Cyrne L, Marinho HS. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Letters* 2004;578:152-156.
3. Antunes F, Cadenas E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radical Biol Med* 2001;30 (9):1008-18.
4. Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 2000;50(45): 251-257.
5. Valderrama B, Ayala M, VazquezDuhalt R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem Biol* 2002;9: 555-565.
6. Hauser MJB, Olsen LF. The role of naturally occurring phenols in inducing oscillations in the peroxidase-oxidase reaction. *Biochemistry* 1998;37:2458-2469.
7. Banci L, Bertini I, Turano P, Tien M, Kirk T.K. Proton NMR investigation into the basis for the relatively high redox potential of lignin peroxidase. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88: 695-660.
8. Nakayama T, Amachi T. Fungal peroxidase; its structure, function, and application. *J Mol Catal B; Enzymatic* 1999;6: 185-198.

9. Bronnikova TV, Schaffer WM, Olsen LF. Nonlinear dynamics of the peroxidase-oxidase reaction: I. Bistability and bursting at low enzyme concentration. *J Phys Chem B* 2001;105: 310-321.
10. Schaffer WM, Bronnikova TV, Olsen LF. Nonlinear dynamics of the peroxidase-oxidase reaction: II. Compatibility of an extended mechanistic model with previously reported model data correspondences. *J Phys Chem B* 2001;105: 5331-5340.
11. Olsen LF, Hauser MJB, Kummer U. Mechanism of protection of peroxidase activity by oscillatory dynamics. *Eur J Biochem* 2003;270: 2796-2804.
12. Gan N, Cai R, Lin Zh. Determination of ascorbic acid based on a peroxidase oscillator reaction. *Anal Chem Acta* 2002;466: 257-260.
13. Adak S, Mazumder A, Banerjee RK. Probing the active site residues in aromatic donor oxidation in horseradish peroxidase: involvement of an arginine and tyrosine residue in aromatic donor binding. *Biochem J* 1996;314: 985-991.
14. Olsen LF, Lunding A, Lauritsen FR, Allegra M. Melatonin activates the peroxidase-oxidase reaction and promotes oscillations. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284: 1071-1076.
15. Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287: 130-134.
16. Doegre DR, Divi RL, Churchwell MI. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal Biochem* 1997;250: 10-17.
17. Nicell JA, Wright H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microbiol Technol* 1997;21: 302-310.
18. Taurog A, Dorris ML, Guziec FS. 1992; An unexpected side reaction in the guaiacol assay for peroxidase. *Anal Biochem* 205: 271-277.
19. Navas Diaz A, Garcia Sanchez F, Gonzales Garcia JA. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminal-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies. *Anal Chim Acta* 1996;327: 161-165.
20. Malarczyk E, Jarosz-Wilkolazka A, Kochmańska-Rdest J. Effects of low doses of guaiacol and ethanol on enzymatic activity of fungal cultures. *Nonlinearity in Biology Toxicology and Medicine* 2003;1(2): 176-184.
21. Malarczyk E, Kochmańska-Rdest J., Paździoch-Czochra M. Effect of low and very low doses of simple phenolics on plant peroxidase activity. *Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine* 2004;2(2):129-141.
22. Elia V, Niccoli M. Thermodynamics of extremely diluted aqueous solutions. *Ann NY Acad Sci* 1999;827:241-248.
23. Elia V, Elia L, Cacace P, Napoli E, Niccoli M, Savarese F. The "extremely diluted solutions" as multivariable systems: a study of calorimetric and conductometric behavior as a function of the parameter time. *J Thermal Analysis and Calorimetry* 2006;84(2): 317-323.
24. Clairborne AC, Fridovich I. Chemical and enzymatic intermediates in the peroxidation of o-dianisidine by horseradish peroxidase. *Biochemistry* 1979;18: 2324-2330.
25. Gill PR, Murray M, Wright MH. The Levenberg-Marquardt method. In: *Practical Optimization*. London: Academic Press; 1981.
26. Zacharias CR. Physical research in dynamized systems. *Med Hypotheses* 2002;58(6):523-526.
27. Calabrese EJ. Overcompensation stimulation: A mechanism for hormetic effects. *Crit Rev Toxicol* 2001;31: 425-470.
28. Calabrese EJ, Baldwin LA. Ushaped dose-responses in biology, toxicology and public health. *Ann Rev Pub Health* 2001; 22: 15-23.
29. Belon P. The effect of histamine dilutions on basophile degranulation. In: Belon P.(ed.) *Research in Homeopathy*. 4th ed. [s.l.] Boiron; 2006.
30. Witt CM, Bluth M, Albrecht H, Weißhuhn TER, Baumgartner S, Willich SN. The in vitro evidence for an effect of high homeopathic potencies: A systematic review of the literature. *Complementary Therapies in Medicine* 2007;15: 128-138.
31. Dittmann J, Kanapin H, Harisch G. Einfluss ausgewählter Homöopathika auf die katalytische Aktivität der Urikase, der sauren Phosphatase und der zytosolischen Glutathion S-Transferasen. *Biol Med* 2000;29(3): 125-131.
32. Dittmann J, Kanapin H, Harisch G. Einfluss ausgewählter Homöopathika auf die katalytische Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase. *Biol Med* 2000;29(6): 289-294.
33. Harisch G, Dittmann J. Unterschiedlicher Einfluß von cAMP-Potenzen und cAMP-Verdünnungen am Beispiel verschiedener Enzymsysteme. *Biol Med* 1998;27(2): 55-62.
34. Malarczyk E, Paździoch-Czochra M. Multiple respiratory bursts as a response to veratrate stress in *Rhodococcus* cells. *Cell Biol Intern* 2000;24(8): 515-527.
35. Manninger K, Csösz M, Tyihak E. Induction of resistance of wheat plants to pathogens by pretreatment with N-methylated substances. *Acta Biol Hung* 1998;49: 275-281.
36. Tyihak E, Steiner U, Schönbeck F. 2001. Time and dose dependent double immune response of plants to pathogens. 13th Intern. Reinhardsbrunn Symposium. Materials. Friedrichroda, May 1418, 2001: 187-196.