

ساختار و عملکرد هورس رادیش پراکسیداز (HRP) تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی

محمدعلی طاهری^۱، سارا ترابی^۲، نوشین نبوی^۳، فرید سمسارها^{۴*}

خلاصه

مطالعه آنزیم‌های زیستی با ویژگی‌های منحصر به فردشان از قبیل اثر متقابل با سوپسترا، تغییرات کنفورماسیونی، نرخ کاتالیتیکی برای تحقیق پایه ای و کاربردی آنزیمی کلیدی است. در میان آنزیم‌ها، هورس رادیش پراکسیداز (HRP) بطور گسترده ای در مطالعه متابولیسم سیستم‌های زیستی استفاده شده است. در این مطالعه، ما تغییرات فعالیت و ساختار هورس رادیش پراکسیداز در دو حالت آزمایشگاهی و ایزوفرم‌های استخراج شده از گیاه تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی (FCF) را اندازه گیری کردیم. هدف ما ابتدا آزمایش اثر FCF بر ساختار و عملکرد HRP و سپس بررسی تکرارپذیری تغییرات سرعت ماکسیمم و ثابت میکائیلیس تحت تاثیر این میدان شعوری (ط) بود. مشاهده کردیم که نمونه آزمایشگاهی HRP در مقایسه با کنترل، ۵ درصد کاهش در سرعت ماکسیمم و ۱۸ درصد افزایش ثابت میکائیلیس را تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی نشان داد. از سوی دیگر، HRP استخراج شده از بافت گیاهی به ترتیب ۶ درصد و ۴۰ درصد افزایش در سرعت ماکسیمم و ثابت میکائیلیس تحت تاثیر FCF نشان داد. بعلاوه، تغییرات در شدت نشر فلوئورسانس، تحت تاثیر تیمار میدان شعوری فرادرمانی تغییرات ساختاری آنزیم را تایید می‌کند.

۱. بخش تحقیق و توسعه ساینسکت،
مرکز تحقیقات CosmoIntel Inc ،
انتاریو، کانادا

۲. دیارتمان زیست گیاهی، دانشکده
زیست شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. خدمات تحقیقات دانشگاه
ویکتوریا، بریتیش کلمبیا، کانادا

۴. انستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک
(IBB)، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول:

فرید سمسارها.

انستیتو بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)،
دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی:
Semsarha@alumini.ut.ac.ir

کلیدواژه‌ها: میدان شعوری فرادرمانی (FCF)، میدان‌های شعوری طاهری، ثابت میکائیلیس، سرعت ماکسیمم، هورس رادیش پراکسیداز

مقدمه

اکسیدوردوکتازها خانواده بزرگی از پراکسیدازها (POXs) هستند (EC:1,11,1,7) که قادرند اکسیداسیون انواع مختلفی از سوبسترهای آلی و غیر آلی را با استفاده از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) کاتالیز کنند (۱). HRP یک آنزیم مهم هم دار از ریشه‌های هورس رادیش (تریچه کوهی) است که در سلولهای بیشتر پستانداران حضور ندارد. شناخت ما از ساختار و عملکرد HRP به وسیله کریستالوگرافی اشعه X (۲) و آنزیم‌های نوترکیب (۳) حاصل شده است. HRP موضوع تحقیقات بسیاری از جمله پزشکی، علوم زیستی، بیوتکنولوژی در درمان سرطان، سیستم‌های حسگر زیستی و غیره بوده است (۴). در گیاهان، ایزو آنزیم‌های HRP در متابولیسم ایندول ۳- استیک اسید، لیگنیفیکاسیون، کراس لینک پلیمرهای دیواره سلولی، تشکیل سوبرین و مقاومت به عفونت و آلودگی دخیل است (۵).

انواع فعال اکسیژن (ROS)، بطور معمول به عنوان محصولی از مسیرهای متابولیسم سلولی تولید می‌شود، اما سطوح آنها تحت تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. این را دیکال‌های آزاد ساختارهای سلولی را تخریب کرده و مرگ برنامه ریزی سلول یا آپوپتوز را القا می‌کنند. گزارش شده است که آنزیم‌ها با بهبود محافظت در مقابل استرس اکسیداتیو می‌توانند از آپوپتوز ناشی از اثر متقابل با پراکسیدها جلوگیری کنند (۶). بعلاوه، مشخص شده است که پراکسیدازها هنگام عفونت پاتوژن مانند قارچ‌ها افزایش فعالیت را نشان می‌دهند (۷). گزارش‌های فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهند افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان منجر به مقاومت بیشتر آنها در مقابل استرس‌های محیطی می‌شود (۸). از سوی دیگر، انواع فعال اکسیژن درون‌زا مانند پراکسید هیدروژن به عنوان مولکول پیام رسان در نظر گرفته می‌شوند که در فرایندهای حیاتی مختلفی مانند تکثیر، تمایز، اصلاح بافتی، التهاب، پیری و غیره شرکت دارند (۹).

ثابت میکائیلیس (Km) و سرعت ماکسیم (Vmax) که بلوک‌های سازنده معادله میکائیلیس-منتن (MM) هستند، به عنوان ثابت‌های عملکردی آنزیم‌ها در نظر گرفته می‌شوند. این ثابت‌ها و پارامترهای دیگر بدست آمده از نسبت‌های مختلف (مانند آهنگ تبدیل آنزیم و ثابت ویژه) در غلظت‌های مختلف سوبسترا و آنزیم محاسبه می‌شوند. معادله MM در مطالعات مختلفی برای بررسی ساختار و عملکرد آنزیم‌های مختلف در شرایط محیطی گوناگون مانند دما و انواع بافر (۱۰). غلظت‌های مختلف مهار کننده و القا کننده (۱۱) و مقایسه ویژگی‌های کینتیکی آنزیم‌های وحشی و جهش یافته اندازه گیری شده است (۱۲).

یکی از موضوعات جالب در طی دهه‌های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ بررسی مقدار این ثابت‌ها و تغییرات آنها در طی تکامل آنزیم‌ها بوده است. برخی مطالعات کاهش و افزایش Km به موازات Kcat و Vmax در طی تکامل (۱۳)، همچنین تغییرات اثری آنها بدلیل سازگاری را را نشان داده‌اند (۱۴). گزارش شده است که در بسیاری از موجودات زنده، مکانیسم‌های کینتیکی برای کمک به بقا در پاسخ به تغییرات فاکتورهای محیطی تکامل یافته است (۱۵).

همه مطالعات کینتیکی آنزیم ذکر شده اثر فاکتورهای فیزیوشیمیایی و محیطی مختلف را بررسی کرده‌اند. در این راستا، مطالعه ای تا بحال اثر بخشی درمانهای ذهن-بدن یا اثر متقابل آگاهی بر فعالیت و عملکرد آنزیم‌ها را آزمایش نکرده است.

در قرن حاضر، ماهیت شعور و جایگاه آن در دنیای علم، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تئوری‌های فلسفی و علمی زیادی در این زمینه ارائه شده است. در دهه ۱۹۸۰، محمد علی طاهری، میدان‌های جدیدی با ماهیت غیرمادی و غیرانرژیایی معرفی کرده است که میدان‌های شعوری طاهری (ط) نامیده میشوند. در این دیدگاه، شعور (ط)، یکی از سه عنصر موجود در جهان هستی به جز ماده و انرژی است.



بر اساس این تئوری، میدان‌های شعوری (ط) متنوع با عملکردهای مختلفی وجود دارد که زیرمجموعه‌ی شبکه اینترنت کیهانی به نام شبکه شعور کیهانی یا CCN^۱ هستند. تفاوت عمده بین تئوری میدان‌های شعوری (ط) با دیگر مفاهیم تئوری ارائه شده در رابطه با شعور، کاربرد و استفاده عملی از میدان‌های شعوری (ط) است. این میدان‌ها قابل اعمال بر همه موجودات زنده و غیر زنده از قبیل انسان‌ها، گیاهان، حیوانات، میکروارگانیسم‌ها، مواد و غیره هستند.

علم جدید ساینسفکت در سال ۲۰۲۰ توسط محمدعلی طاهری، بنیانگذار مکتب عرفان کیهانی حلقه به عنوان یکی از زیر مجموعه‌های این مکتب، معرفی شده است. نام «ساینسفکت»، به این دلیل انتخاب شده است که از تحقیقات علمی به منظور تایید وجود شعور (ط) به عنوان یک «وجود مسلم» (فکت) استفاده می‌کند. اگرچه علم رایج، صرفاً مطالعه ماده و انرژی را مدنظر دارد و در مقابل، ساینسفکت اثرات میدان‌های شعوری (ط) (غیرمادی و غیر انرژیایی) را کاوش می‌کند؛ اما، ساینسفکت با انجام تحقیقات آزمایشگاهی تکرار پذیر در حوزه‌های مختلف علم، زمینه مشترکی را بین این دو پدیدار نموده و از این قابلیت به منظور اثبات «شعور (ط)» و «میدان‌های شعوری (ط)» ناشی از آن، استفاده کرده است.

اثرگذاری میدان‌های شعوری (ط) با اتصال بین شبکه شعور کیهانی به عنوان شعور کل و موضوع مورد مطالعه به عنوان جزء آغاز می‌شود. اتصال توسط ذهن فرادرمانگر (فرد آموزش دیده‌ای که میدان‌های شعوری (ط) به او تفویض شده است) برقرار می‌گردد. ذهن انسان نقشی واسط (اعلام کننده) را دارد که با یک توجه کوتاه و آنی (نظر) به موضوع مورد مطالعه عمل کرده و دستاورد اصلی، در نتیجه اثرات میدان‌های شعوری (ط) حاصل می‌شود. این میدان‌ها مستقیماً قابل اندازه گیری توسط علم نیستند، اما می‌توان

اثرات آنها را بر موضوعات مختلف از طریق آزمایش‌های تکرار پذیر بررسی کرد (۱۶).

پایه‌ریزی تحقیقات اولیه «شعور (ط)» بر اساس سلسله مراتب فرض، حکم و برهان صورت گرفته که در آن، فرض اولیه: شکل‌گیری کیهان از جزء سومی متفاوت از ماده و انرژی به نام «شعور (ط)» است، حکم: وجود «شعور (ط)» (میدان‌های شعوری (ط)) میتواند توسط اثراتش بر روی ماده و انرژی (مانند انسان، حیوان، گیاه، میکروارگانیسم، سلول‌ها، مواد و غیره) اثبات شود، برهان: تایید علمی اثرات میدان‌های شعوری (ط) بر ماده و انرژی (مطابق حکم تعیین شده) است که از طریق انجام آزمایش‌های علمی تکرار پذیر مختلف انجام می‌شود. بر این اساس، با هدف اثبات وجود، اثربخشی و مکانیسم میدان‌های شعوری (ط) و تحلیل‌های آن، فازهای تحقیقاتی صفر تا چهار و اهداف هر کدام در این راستا به شرح زیر تعریف می‌گردد؛

هدف تحقیقات در فاز صفر: اثبات وجود میدان‌های شعوری (ط) با مشاهده اثرات آنها است. در این فاز به ماهیت و چیستی شعور (ط) پرداخته نخواهد شد. فاز اول: به بررسی تنوع اثرگذاری میدان‌های شعوری (ط) ناشی از «شعور (ط)» می‌پردازد. فاز دوم: چرایی تنوع اثرگذاری میدان‌های شعوری (ط) را بررسی می‌کند. فاز سوم: بررسی مکانیسم اثرات میدان‌های شعوری (ط) بر ماده و انرژی را به عهده دارد. نهایتاً، فاز چهارم: نتیجه‌گیری‌های کلان به ویژه در ارتباط با ذهن و حافظه ماده و ارتباط آن با «شعور (ط)» و غیره را خواهد گرفت.

در مطالعات قبلی بر گیاه گندم، ما مشاهده کردیم که میدان شعوری (ط) اثرات منفی تنش شوری را با القای فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاهش داد (۱۷). همچنین مطالعات دیگر تاثیر محسوس و قابل اندازه گیری میدان شعوری فرادرمانی را بر فعالیت الکتریکی مغز در حین ارتباط با CCN (۱۸)، رده سلول

۱. Cosmic Consciousness Network

سرطانی MCFY (۱۹)، بیماری آلزایمر (۲۰) (۲۱)، رشد باکتری (۲۲) و ویروس (۲۳). به منظور بدست آوردن نگاه دقیق تری به ابعاد مولکولی و شواهد اثرگذاری و نوع عملکرد میدان شعوری فرادرمانی، این مطالعه، اثر میدان شعوری فرادرمانی بر HRP در دو حالت آزمایشگاهی و استخراج شده را بررسی می‌کند. فعالیت و عملکرد آنزیمی طبق اصول آنزیمولوژی و تحت تاثیر میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با گروه کنترل و بدون تیمار آنالیز می‌شود.

مواد و روش

در این مطالعه، ما از HRP تهیه شده از دو منبع استفاده کردیم. اولین HRP آزمایشگاه، برند کارخانه سیگما و دومین HRP استخراج شده از گیاه هورس رادیش. این تنوع در طراحی اثرگذاری بر آنزیم از دو منبع، امکان تکرارپذیری تیمار میدان شعوری فرادرمانی در زمان‌های بیشتر و مراحل بیشتر را برای ما فراهم می‌کند. بخش‌های مواد و روش‌های مربوطه برای هر منبع بطور مجزا ارائه شده است.

کاربرد میدان شعوری فرادرمانی

نمونه‌های مورد مطالعه تحت تاثیر میدان‌های شعوری (ط) بر اساس پروتکل‌هایی در وب سایت مدیریت تحقیقات در میدان‌های شعوری (ط) (www.COSMOintel.com) قرار گرفتند. درخواست اتصال به شبکه شعور کیهانی برای استفاده از میدان شعوری فرادرمانی را می‌توان از طریق وب سایت COSMOintel در بخش مربوط به «اعلام نظر» قرار داد. این دسترسی برای همه افراد بطور رایگان امکان پذیر است. به منظور تجربه میدان‌های شعوری (ط) و انجام پژوهش در این زمینه، در هر زمانی، محققین می‌توانند در این وب سایت ثبت نام کنند. جزئیات دقیقی از آزمایش لازم است در اختیار مرکز تحقیقاتی

قرار بگیرد، به عنوان مثال، شماره و نام نمونه‌ها و کنترل باید مشخص شود. این مطالعه به صورت دو سو کور انجام شده است بطوری که کارشناسان هیچ شناختی از تئوری میدان‌های شعوری (ط) نداشتند. همچنین، فردی که ارتباط پیوند شعوری را برقرار کرده است هیچ گونه آشنایی با جزئیات این تحقیق نداشت. دوسوکور یک استاندارد مهم است که در آزمایش‌های علمی در زمینه پزشکی و روانشناسی که شامل تست‌های نظری و عملی است، رایج است.

مقیاس آزمایشگاهی HRP

مواد: HRP، (اکسیدوردوکتاز، EC 1,11,1,7) و Tetramethylbenzidine (TMB-5,5',3,3') از کمپانی سیگما خریداری شدند. سایر معرف‌ها و مواد شیمیایی دارای گرید آنالیتیکی بودند. در این آزمایش‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

روش‌ها

اسپکتروفتومتری UV/Vis با اسپکتروفتومتری مدل واریان بيو Cary ۱۰۰ انجام شد. طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس مدل واریان Cary Eclipse با عرض شکاف برانگیختگی و نشر ۵ نانومتر اندازه گیری شد. نشر فلورسانس برای Trp با استفاده از برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر برای جلوگیری از مشارکت تیروزین اندازه گیری شد. در مطالعات فلورسانس ذاتی، غلظت پروتئین ۹۰/۴ میکرومولار در ۰/۲ مولار بافر فسفات پتاسیم، pH ۷/۰ بود.

سنجش آنزیم

از محلول‌های آنزیمی تازه تهیه شده در طی آزمایش استفاده شد. محلول استوک آنزیم با حل کردن HRP (۱/۵ میلی گرم) در PBS (۳ میلی لیتر، ۰/۱ مولار، pH ۷) تهیه و در یخ نگهداری شد. محلول استوک

پراکسید هیدروژن (۰/۱ مولار) با رقیق کردن پراکسید هیدروژن (۰/۵ میلی لیتر، ۳۰ wt %) در ۵۰ میلی لیتر PBS (۰/۱ مولار، pH ۷). واکنش‌های آنزیمی HRP در PBS (۰/۱ M، pH ۷) در ۲۰ درجه سانتی گراد انجام شد. همه واکنش‌های آنزیمی در کووت فرابنفش - مرئی کوارتز در سه تکرار انجام شد. حجم نهایی محلول واکنش ۱/۵ میلی لیتر بود. آزمایش‌ها در حضور غلظت ثابتی از HRP (۵۰ میکرولیتر) و پراکسید هیدروژن (۱۰ میکرولیتر) با غلظت مختلف TMB (۱/۲۳، ۱/۸۵، ۳/۷، ۷/۴، ۱۱/۱ و ۱۴/۸ میلی مولار). تغییرات کلرومتریکی با ثبت جذب در ۶۵۲ نانومتر تعیین شد.

پارامترهای کینتیکی: ثابت‌های کینتیکی K_m و V_{max} با قرار دادن مقادیر سرعت واکنش و غلظت‌های سوبسترا در معادله میکائیلیس - منتن به صورت زیر محاسبه شد:

$$V = (V_{max} \times [S]) / (K_m + [S])$$

که V سرعت اولیه واکنش و V_{max} ماکسیمم سرعت واکنش است که در غلظت‌های اشباع سوبسترا مشاهده می‌شود. $[S]$ غلظت سوبسترا و K_m ثابت میکائیلیس است. در همه مراحل، دو ظرف با علامت‌های مختلف بلنک و نمونه در نظر گرفته شد.

HRP استخراج شده

مواد: Tetramethylbenzidine (TMB-5,5',3,3) از کمپانی سیگما خریداری شد. ریشه‌های هورس رادیش از بازار محلی خریداری شد. سایر معرفها و مواد شیمیایی دارای گرید آنالیتیکی بودند. در آزمایشها از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

روش ها

استخراج آنزیم:

حدود ۱۰۰ گرم از هورس رادیش کاملاً با آب شسته و به

قطعات کوچک بریده شد و در مخلوط کن با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر همگن شد. به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۰,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. فیلتراسیون در حمام آب دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۳ دقیقه انجام شد تا کاتالازها غیرفعال شود و به سرعت در آب یخ سرد شد. آنزیم توسط سولفات آمونیوم برای تصفیه جزئی ته نشین شد. آمونیوم سولفات جامد به ۱۰۰ میلی لیتر از پراکسیداز در غلظت ۳۰٪ (w/v) اضافه شد. سوسپانسیون برای نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هم زده شد. پس از تکان دادن کافی، رسوبات با سانتریفیوژ با ۱۰,۰۰۰ rpm جمع آوری شد. فعالیت آنزیم برای هر غلظت تعیین شد و رسوبات برای تخلیص بیشتر جمع آوری گردید.

دیالیز: قبل از روند دیالیز، کیسه دیالیز با محلول ۰/۱ مولار سدیم کربنات برای ۱ ساعت جوشانده شد و سپس برای یک شب نگهداشته شد. این پروسه باعث می شود کیسه دیالیز باز شود. رسوب بدست آمده با آمونیوم سولفات در کیسه دیالیز با بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH ۶/۵) با بهم خوردن ثابت برهمزن مگنتیک برای مدت ۲ ساعت دیالیز شد. رسوبها تحت سنجش آنزیم و تخمین پروتئین قرار گرفتند. **تخمین پروتئین:** پروتئین‌ها بر طبق روش Lowry (۲۴)(۱۹۵۱) تخمین زده شدند. معرف‌های استفاده شده شامل: محلول A=سدیم کربنات در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر، محلول B= 0.38 g CuSO₄.5H₂O و 0.6 g تاراتارات سدیم-پتاسیم در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر، محلول C= یک بخش معرف فولین، محلول D= 1N NaOH.40 g.

اسپکتروفتومتری UV/Vis:

با اسپکتروفتومتر مدل واریان Cary Bio 100 ثبت شد. فلورسانس ذاتی پروتئین در ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس مدل واریان Cary Eclipse با برانگیختگی و عرض شکاف نشر ۵ نانومتر

اندازه گیری شد. نشر فلورسانس برای Trp با استفاده از برانگیختگی در ۲۹۵ نانومتر برای جلوگیری از مشارکت تیروزین اندازه گیری شد. در مطالعات فلورسانس ذاتی، غلظت پروتئین ۴۵/۲ میکرومولار در ۰/۲ مولار بافر فسفات پتاسیم، pH ۷ بود.

سنجش آنزیم: از محلول های آنزیمی تازه تهیه شده در طی آزمایش استفاده شد. محلول استوک آنزیم با حل کردن HRP (۱/۵ میلی گرم) در PBS (۳ میلی لیتر، ۰/۱ مولار، pH ۷) تهیه و در یخ نگهداری شد. محلول استوک پراکسید هیدروژن (۰/۱ مولار) با رقیق کردن پراکسید هیدروژن (۰/۵ میلی لیتر، ۳۰ wt %) در ۵۰ میلی لیتر PBS (۰/۱ مولار، pH ۷). واکنش های آنزیمی HRP در PBS (۰/۱ مولار، pH ۷) در ۲۰ درجه سانتی گراد انجام شد. همه واکنش های آنزیمی در کووت فرابنفش - مرئی کوارتز در سه تکرار انجام شد. حجم نهایی محلول واکنش ۱/۵ میلی لیتر بود. آزمایش ها در حضور غلظت ثابتی از HRP (۵۰ میکرولیتر) و پراکسید

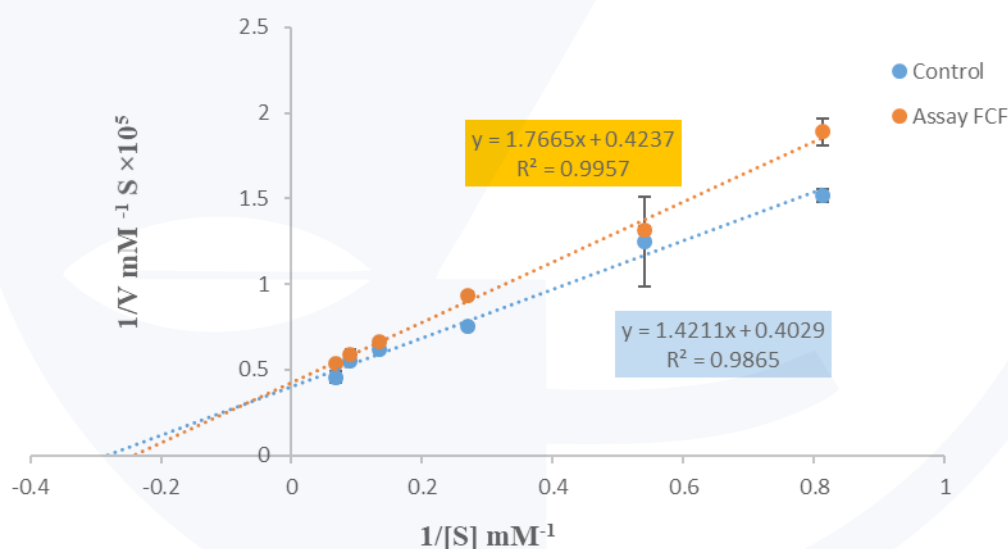
هیدروژن (۱۰ میکرولیتر) با غلظت مختلف TMB (۱/۲۳، ۱/۸۵، ۳/۷، ۷/۴، ۱۱/۱ و ۱۴/۸ میلی مولار). تغییرات کلرومتریک با ثبت جذب در ۶۵۲ نانومتر تعیین شد. **پارامترهای کینتیکی:** همه مراحل و انواع ثابت کینتیک و محاسبات بطور مشابه با جزئیات ذکر شده در بخش قبلی انجام شد.

نتایج

گريد آزمایشگاهی HRP

نتیجه تیمار میدان شعوری فرادرمانی بر- Lineweaver Burk plot گريد آزمایشگاهی HRP در شکل ۱ نشان داده شده است.

محتوای کینتیکی HRP آزمایشگاهی در جدول ۱ و بر اساس داده های شکل ۱ نشان داده شده است. براساس جدول ۱، تیمار میدان شعوری فرادرمانی HRP آزمایشگاهی در طی سنجش کینتیکی باعث به ترتیب

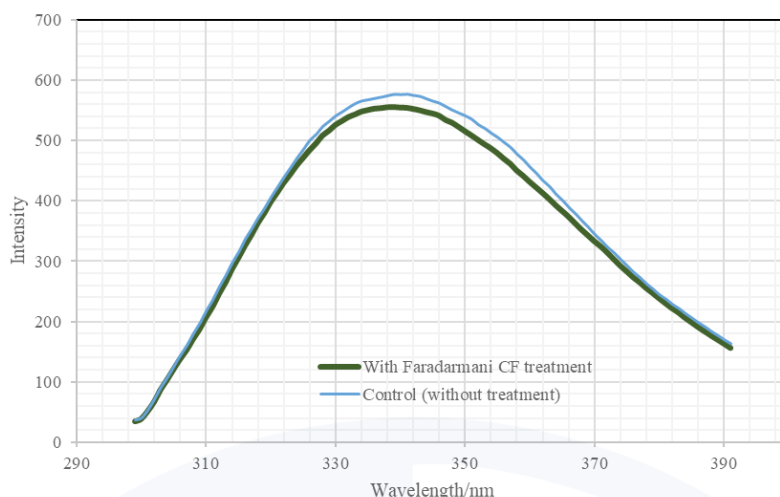


شکل ۱: اثر میدان شعوری فرادرمانی بر- Lineweaver-Burk plot فعالیت HRP آزمایشگاهی در کاتالیز H_2O_2 در مقایسه با کنترل.

جدول ۱: محاسبه ثابت های کینتیک برای نمونه HRP آزمایشگاهی

	Vmax	Km	kcat	kcat/Km	% Δ	% Δ	% Δ	% Δ
	(mM/s) × 10 ⁻⁵	(mM)	(s ⁻¹)	(M ⁻¹ s ⁻¹)	Vmax	Km	kcat	kcat/Km
Control (None)	2.48	3.52	0.0620	17.6	-	-	-	-
Assay + FCF	2.36	4.16	0.0589	14.2	-4.8%	18.2%	-5.0%	-5.0%





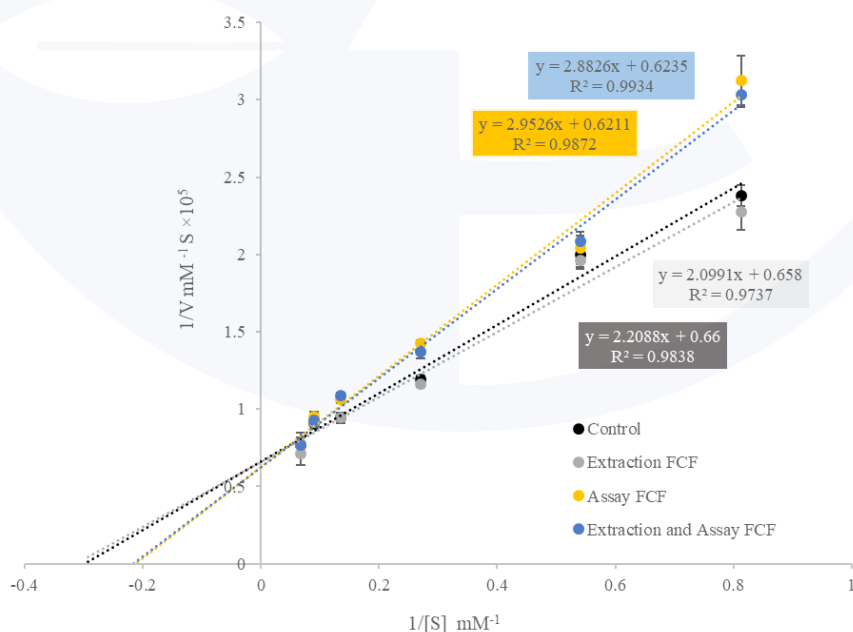
شکل ۲: نشر فلورسانس نمونه HRP آزمایشگاهی تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با کنترل.

HRP استخراج شده

چون تیمار در دو مرحله از استخراج و اندازه گیری کینتیک انجام شد، چهار نوع اندازه گیری (تست های ۱-۴) انجام شد (کنترل بدون FCF، تیمار FCF در طی سنجش، FCF در طی استخراج و سنجش) و مقادیر سرعت ماکسیمم و ثابت میکادیلپس همانطور که در جدول ۲ نشان داده شد با استفاده از Lineweaver-Burk Plot هر تست اندازه گیری شد (شکل ۳).

۴/۸ درصد کاهش و ۱۸/۲ درصد افزایش در V_{max} و K_m آنزیم شد. بعلاوه، راندمان عملکرد و ثابت ویژه HRP آزمایشگاهی تحت تیمار حدود ۵ درصد و ۱۹ درصد به ترتیب کاهش یافت.

تغییر در نشر فلورسانس در گرید آزمایشگاهی HRP در مقایسه با کنترل (بدون تیمار) در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس این تصویر تیمار میدان شعوری فرادرمانی باعث کاهش ۴ درصد در شدت نشر فلورسانس به عنوان تغییر کنفورماسیون در HRP شد.

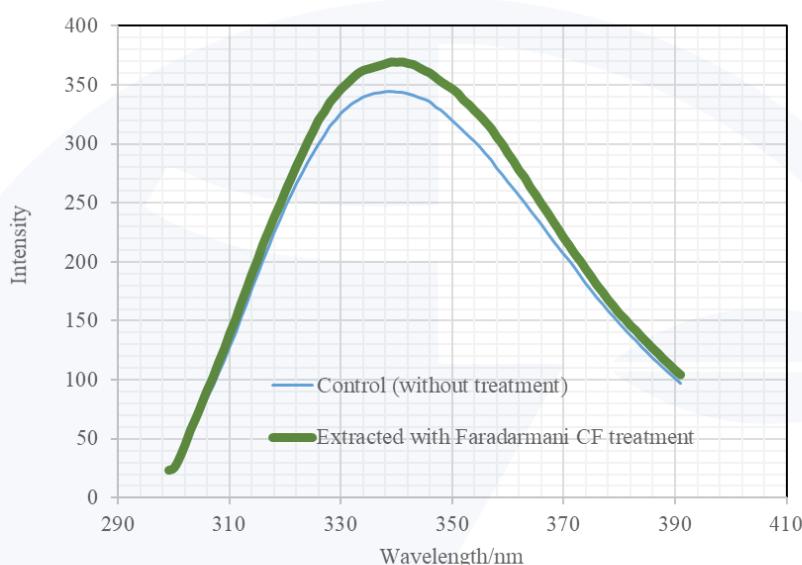


شکل ۳: اثر میدان شعوری فرادرمانی بر فعالیت HRP استخراج شده در کاتالیز H_2O_2 در ۲، ۳ و ۴ تست ذکر شده در جدول ۲ در مقایسه با کنترل (تست ۱).

جدول ۲: محاسبه ثابت‌های کینتیکی برای نمونه‌های HRP استخراج شده بر اساس Lineweaver-Burk plots

Test No.	FCF Treatment	Vmax (mM/s)×10 ⁻⁵	x Km (mM)	kcat	kcat/Km	% Δ Vmax	% Δ Km	% Δ kcat	% Δ kcat/Km
1	Control (None)	1.51	3.34	0.0377	11.3	-	-	-	-
2	Extraction + FCF	1.52	3.19	0.0379	11.9	0.7%	-4.5%	0.5%	5.3%
3	Assay + FCF	1.61	4.76	0.0403	8.45	6.6%	42.5%	6.9%	-25.2%
4	Extraction & Assay + FCF	1.60	4.62	0.0400	8.65	6.0%	38.3%	6.1%	-23.5%

FCF*: میدان شعوری فرادرمانی



شکل ۴: نشر فلورسانس HRP استخراج شده تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با کنترل.

در درجه‌ی اول تاییدی بر اثرگذاری میدان غیرمادی و غیر انرژی‌ی شعوری (ط) بر ساختار و عملکرد HRP در شرایط فیزیکیال مشابه نمونه تحت تیمار میدان شعوری (ط) فرادرمانی و کنترل است. دوماً، افزایش مقادیر K_m آنزیم در گروه تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی نشان می‌دهد غلظت بالاتری از سوبسترا نیاز است. نهایتاً، تغییر در عملکرد آنزیم همراه با تغییر ساختاری، که با تکنیک فلورسانس اندازه‌گیری شد، اثر میدان شعوری فرادرمانی بر موضوع مورد مطالعه را آشکار می‌کند.

مطالعات قبلی در رابطه با تکامل آنزیم‌ها افزایش در K_m و K_{cat} آن، مربوط به تغییرات در مسیرهای عملکردی آنزیم در طی تکامل شان را نشان داده اند

جدول ۲ مقادیر ثابت‌های بدست آمده در تست‌های مختلف و مقایسه آنها با کنترل را نشان می‌دهد. شکل ۴ شدت نشر فلورسانس آنزیم استخراج شده تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با کنترل (آنزیم استخراج شده بدون تیمار) را نشان می‌دهد که ۷ درصد افزایش در نشر فلورسانس مشاهده می‌شود.

بحث

در این مطالعه، اثر میدان شعوری فرادرمانی بر ساختار و عملکرد HRP در دو حالت خالص آزمایشگاهی و استخراج شده از گیاه بررسی شد. نتایج این تیمار



(۲۵). چون اندازه گیری ثابت‌ها در شرایط محیطی مشابه تغییرات محدودی در دامنه نوسانات خطاهای آزمایشگاهی ایجاد می‌کند، نتایج، خصوصا در مقادیر K_m نشان می‌دهد که میدان شعوری احتمالا به عنوان یک مکانیسم برای تغییرات تکاملی آنزیم در زمان کوتاه مطالعه استفاده کرده است.

افزایش مقدار K_m در محیط با افزایش غلظت سوبسترا (وضعیت سنجش کینتیک) ویژگی رفتاری در آنزیم ایجاد کرده است که آنزیم را مهیای پذیرش سوبستراهای متنوع می‌کند. از سوی دیگر، افزایش K_{cat} در آنزیم استخراج شده تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی، در طی استخراج و سنجش کینتیکی، مطابقت قابل توجهی با عملکرد عمومی HRP نشان می‌دهد. قابل ذکر است که کاهش ۴ درصد در K_m در تیمار حین استخراج (تست ۳) و تغییرات در مقادیر ویژگی‌های عملکردی همان آنزیم تحت تیمار حین آزمایش (تست ۴) پیشنهاد می‌کند رفتار میدان شعوری فرادرمانی تکرار پذیر است.

بر اساس نظریه طاهری، شبکه شعوریکیهانی (CCN) حاوی همه داده و اطلاعات ساختاری و عملکردی همه اجزای سازنده جهان هستی است و قادر است رفتار همه اجزای سازنده و ذراتی که در ارتباط با میدان‌های شعوری (ط) قرار می‌گیرند را بهینه سازد. در تیمار فرادرمانی، با برقرار اتصال با نظر توسط اعلام کننده، یک ارتباط بین اجزای سازنده سیستم تحت مطالعه (شعور جزء) و شبکه شعور کیهانی (شعور کل) برقرار می‌شود. فرادرمانی و دیگر میدان‌های شعوری (ط)، توسط ذهن انسان واسطه‌گری می‌شوند (یک اعلام کننده). در حقیقت، ذهن انسان، مانند یک پل، ارتباطی بین شعور جزء و شعور کل، یک پیوند شعوری با CCN، برقرار می‌کند که سپس از داده‌های مورد نیاز برای ارتقا و بهینه سازی سیستم تحت مطالعه استفاده

می‌کند.

در این مطالعه، نمونه آزمایشگاهی HRP، افزایش حدود ۱۸ درصد در K_m و کاهش حدود ۵ درصد V_{max} و حدود ۵ درصد K_{cat} را نشان داد. در حالیکه نمونه HRP استخراج شده، افزایش قابل توجه ۴۰ درصد K_m و افزایش V_{max} حدود ۶ درصد و ۶ درصد K_{cat} را نشان داد. در هر دو نمونه اثر قابل توجه میدان شعوری فرادرمانی بر کینتیک آنزیمی مشاهده شد. تغییر در V_{max} و K_{cat} همراه با تغییرات شدت نشر فلورسانس در شکل ۲ و ۴ نشان داده شده است. هنگامیکه V_{max} و K_{cat} کاهش می‌یابد، شدت نشر کاهش یافته و وقتی V_{max} و K_{cat} افزایش می‌یابد، شدت نشر فلورسانس افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که اثر میدان شعوری فرادرمانی بر HRP تغییر قابل اندازه گیری در ساختار و عملکرد آنزیم ایجاد می‌کند و وجود میدان شعوری فرادرمانی را تایید می‌نماید.

تفاوت‌های مشاهده شده بین نمونه‌های استخراج شده و آزمایشگاهی، با توجه به تئوری طاهری، به دلیل مجاورت اثر شعور (ط) محیط طبیعی (گیاه هورس رادیش) بر آنزیم HRP می‌باشد. در نمونه استخراج شده HRP افزایش در فعالیت کاتالیتیکی تحت میدان شعوری فرادرمانی مشاهده کردیم درحالیکه در تیمار آنزیم آزمایشگاهی لیوفیلیزه، کاهش در فعالیت کاتالیتیکی مشاهده شد که بنظر میرسد نتیجه جدایی طولانی مدت HRP آزمایشگاهی از ارگانیسم تولید کننده (گیاه هورس رادیش) و مراحل صنعتی آماده سازی آنزیم بوده است. این یافته‌ها از اثرات میدان شعوری فرادرمانی بر HRP با تغییرات قابل توجه در کینتیک HRP، نشان دهنده وجود آن است و نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه‌های دیگر زیستی و علوم فیزیکی و شیمیایی است. مطالعات بیشتر بر اثر میدان شعوری فرادرمانی بر انواع دیگر آنزیم‌های حیاتی و پروتئین‌ها توسط نویسندگان این مطالعه دنبال می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه از دپارتمان سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، ایران برای فراهم کردن امکانات جهت بدست آوردن داده‌های این پژوهش تشکر می‌کنند. همچنین، از دکتر Carl Mendez، مینا منفرد و مهرناز منزوی، جهت مرور

نوشتار انگلیسی و نظرات ارزشمندشان تشکر می‌کنند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تضاد منفعی وجود ندارد.

منابع

1. Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CA. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*. 2002;93(2):143-58.
2. Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature structural biology*. 1997;4(12):1032-8.
3. Smith AT, Santama N, Dacey S, Edwards M, Bray RC, Thorneley R, et al. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(22):13335-43.
4. Krainer FW, Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015;99(4):1611-25.
5. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249-59.
6. Khavari-Nejad S, Attar F. In Vitro study of acriflavine interaction with horseradish peroxidase C. *Biomacromolecular Journal*. 2015;1(1):130-9.
7. Harrison SJ, Curtis MD, McIntyre CL, Maclean DJ, Manners JM. Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI*. 1995;8(3):398-406.
8. Demiral T, Türkan I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and experimental botany*. 2005;53(3):247-57.
9. Sies H. Role of metabolic H_2O_2 generation: redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(13):8735-41.
10. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*. 2014;1(1-6):41-55.
11. Lopina OD. Enzyme inhibitors and activators. *Enzyme inhibitors and activators: IntechOpen*; 2017.
12. Humer D, Spadiut O. Improving the performance of horseradish peroxidase by site-directed mutagenesis. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(4):916.
13. Fersht AR. Catalysis, binding and enzyme-substrate complementarity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1974;187(1089):397-407.
14. Crowley PH. Natural selection and the Michaelis constant. *Journal of Theoretical Biology*. 1975;50(2):461-75.
15. Ulusu NN. Evolution of enzyme kinetic mechanisms. *Journal of molecular evolution*. 2015;80(5):251-7.
16. Taheri MA. Human from Another Outlook [2nd Edition]2013.
17. Torabi S, Taheri M, Semsarha F. Alleviative effects of Faradarmani Consciousness Field on *Triticum aestivum* L. under salinity stress [version 3; peer review: 1 approved]. *F1000Research*. 2021;9(1089).
18. Taheri MA, Semsarha F, Modarresi-Asem F. An Investigation on the Electrical Activity of the Brain during Fara-Darmani Connection in the Fara-Therapist Population. 2020.
19. Taheri MA, Semsarha F, Mahdavi M, Afsartala Z, Amani L. The Influence of the Faradarmani Consciousness Field on the Survival and Death of MCF-7 Breast Cancer Cells: An Optimization Perspective. Available at SSRN 3705537. 2020.
20. Taheri MA, Torabi S, Nabavi N, Semsarha F. Influence of Faradarmani Consciousness Field (FCF) on Spatial Memory and Passive Avoidance Behavior of Scopolamine Model of Alzheimer Disease in Male Wistar Rats. Available at SSRN 3761188. 2021.

21. Taheri MA, Torabi S, Nabavi N, Semsarha F. Faradarmani Consciousness Field Suppresses Alzheimer's Disease Development in Both in Vitro and in Vivo Models of The Disease. 2021.
22. Taheri MA, Zarrini G, Torabi S, Nabavi N, Semsarha F. Influence of Fara-darmani Consciousness Field on Bacterial Population Growth. bioRxiv. 2021.
23. Taheri MA, Etemadi MR, Torabi S, Nabavi N, Semsarha F. Evaluation of the Influence of Faradarmani Consciousness Field on Viral Growth. 2021.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry. 1951;193(1):265-75.
25. PETERSSON G. Effect of evolution on the kinetic properties of enzymes. European journal of biochemistry. 1989;184(3):561-6.

