

تأثیر میدان شعوری فرادرمانی بر محیط کشت سلولی، آلودگی باکتریایی کشت سلولی و نیز تکثیر ویروس کرونا در آزمایشگاه

* نویسنده مسئول: حسین کیوانی
ایمیل: Keyvanlab@yahoo.com

محمدعلی طاهری^۱، لاله امانی^۲، سیمین شریفی^۳، احمد خلیلی^۴، علی زمان وزیری^۵، حسین کیوانی^{۵*}

DOI: <https://doi.org/10.61450/joci.FA.v1i1.78>

۱. بخش تحقیق و توسعه‌ی ساینس‌فکت، مرکز تحقیقات کامپاينتل، انتاریو، کانادا
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. مرکز تحقیقات زیست‌پزشکی سرطان، تهران، ایران
۵. گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

ویروس کرونا SARS-CoV-2 که بسیار مسری و تهدیدکننده‌ی زندگی است از دسامبر ۲۰۱۹ باعث شیوع جهانی کوید-۱۹ شده است، نوعی ویروس بتا است که به سرعت گسترش یافته و به بیماری همه‌گیر جهانی تبدیل شده است. تاکنون برای این بیماری درمان قطعی یافت نشده است. میدان شعوری فرادرمانی یکی از انواع میدان‌های شعوری (TCFs) است و محمدعلی طاهری آن را به عنوان میدان نوینی که نه ماده است و نه انرژی معرفی کرده است. بنابراین، کمیت‌پذیر نیست و ما نمی‌توانیم به‌طور مستقیم آن را اندازه‌گیری یا ارزیابی کنیم اما این امکان وجود دارد که تأثیرات آن به وسیله‌ی آزمایش‌های علمی استاندارد بررسی شود. هدف از مطالعه‌ی حاضر، مطالعه‌ی تأثیر فرادرمانی بر تکثیر ویروس کرونا در آزمایشگاه و فلاسک‌های کشت سلولی آلوده به باکتری است. نتایج این مطالعه نشان داد میدان شعوری فرادرمانی در کشت ویروس باعث القا تکثیر ویروس شد و در فلاسک‌های کشت سلولی آلوده‌شده به وسیله‌ی باکتری، تفاوت‌های چشم‌گیری در رنگ، کدورت و ماندگاری کشت سلولی Vero بین دو گروه تیمار شده با میدان شعوری فرادرمانی و گروه شاهد مشاهده شد که نشان دهنده‌ی اثر معنادار میدان شعوری فرادرمانی است. به منظور بررسی اثربخشی میدان شعوری فرادرمانی، مطالعات در سطح *in vivo* پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: COVID-19، SARS-CoV-2، فرادرمانی، میدان‌های شعوری طاهری، شعور(ط)، تکثیر

مقدمه

انتقالی ویروس (VTM) قرار داده شدند و در همان روز به سرعت تحت دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد به واحد آزمایشگاهی با سطح ایمنی سه برای انجام کشت و تکثیر ویروس انتقال داده شدند. محیط انتقالی حاوی DMEM با گلوکز بالا، ۲٪ محلول پنی‌سیلین-استرپتومایسین و پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریپسین بود.

کشت سلول های Vero

هجده فلاسک T-25 (از فلاسک T-75 یکسان) با 5×10^6 سلول‌های Vero در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا (Gibco) و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco) کشت داده شده و در ۵٪ کربن دی‌اکسید در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و هنگامی که به ۸۰٪ confluency رسیدند، هجده فلاسک به سه گروه با شش فلاسک تقسیم شدند.

در گروه یک، سه فلاسک به عنوان فلاسک تیمار برای تاثیر میدان شعوری فرادرمانی بر سلول و سه فلاسک به عنوان کنترل و بدون اثر میدان شعوری فرادرمانی در نظر گرفته شد. این سلول‌ها روزانه به مدت سه‌روز تا کامل شدن confluency بررسی شدند. در گروه دوم، سه فلاسک کشت سلولی به عنوان فلاسک تیمار برای تاثیر میدان شعوری بر تکثیر ویروس، بررسی اثر سیتوپاتیک، تعیین TCID₅₀ و CPE (اثر سیتوپاتیک) و سه فلاسک برای کشت ویروس به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در گروه سوم، سه فلاسک کشت شده برای بررسی اثر میدان شعوری فرادرمانی بر آلودگی کشت سلول با باکتری و سه فلاسک باقی‌مانده برای کنترل در نظر گرفته شدند.

تهیه‌ی نمونه‌های ویروس، تلقیح و جداسازی در کشت سلول

سوسپانسیون ۱۲ نمونه با PBS (محلول بافر فسفات) رقیق و مخلوط و انتخاب شد. سپس حدود ۲۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن، سوسپانسیون دو بار با فیلترهای غشایی با منافذ ۰/۴۵ و سپس ۰/۲۲ میکرومتر تحت هود لامینار فیلتر شد.

روش جداسازی با فلاسک T-25 با یک رده‌ی سلول Vero دنبال شد. ابتدا، محیط فلاسک دور انداخته شد و به دنبال تلقیح (۱۰۰۰ میکرولیتر نمونه‌ی ویروس) و دوره‌ی جذب ویروس (۱،۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂) محیط کشت برداشته شد و محیط تازه (DMEM) گلوکز بالا با ۲٪ سرم) اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂ انکوبه شد. طی شش‌روز، هر روز CPE با استفاده از میکروسکوپ اینورت ثبت شد. نمونه‌ها در روز ششم برای تایید جداسازی ویروس برای RT real time-PCR فرستاده شدند.

سپس، ویروس‌های جدا شده با استفاده از روش Reed-Muench از رقت ۱۰۳ تا ۱۰۸ در میکروپلیت ۹۶ خانه تیتراژ شدند [۹]. فلاسکی که در آن CPE مشاهده شده بود با تایید تست RT real time-PCR و تیتراسیون ویروس برای ذخیره تا زمان استفاده برای

در بیست‌سال گذشته، جهان شاهد سه پاتوژن ویروس کرونای در حال ظهور به نام‌های سارس (سندرم تنفسی حاد شدید)، مرس (سندرم تنفسی خاورمیانه) و پاندمی SARS-CoV-2 بوده است. ویروس SARS-CoV-2 عضو جدیدی از خانواده بتا کرونا ویروس‌ها است که وجود آن نخستین بار در اواسط دسامبر سال ۲۰۱۹ در چین گزارش شد و سپس به سرعت در سراسر جهان گسترش یافت و به بیماری‌ای همه‌گیر تبدیل شد [۱]. بنابراین، این که درمان‌های موثر برای جلوگیری از شیوع و مرگ‌ومیر ناشی از ویروس‌های کرونا در نظر گرفته شود، ضروری است [۲].

بر اساس نظریه‌ی طاهری، شعور(ط) مولفه‌ی اساسی کیهان است که ماده، انرژی و اطلاعات از آن منشا گرفته‌اند. همچنین، میدان‌های شعوری(ط) متنوعی با عملکردهای گوناگون معرفی شده‌اند. این میدان‌ها ماهیت غیرفراکانسی دارند و نمی‌توان به‌طور مستقیم آن‌ها را با ابزارهای کمی اندازه‌گیری کرد. اما این امکان وجود دارد که با طراحی آزمایش‌هایی اثرات این میدان‌ها را ثبت و بررسی کرد. اثر میدان‌های شعوری با توجه کوتاه و آنی فرادمانگر (فرد آموزش دیده) به موضوع مورد مطالعه آغاز می‌شود [۳]. در تحقیقات قبلی تاثیر میدان‌های شعوری بر سلول سرطانی MCF7 [۴]، حافظه‌ی فضایی و رفتار اجتنابی مدل موش صحرایی با بیماری آلزایمر [۵]، گیاه گندم [۶]، رشد جمعیت باکتریایی [۷] و فعالیت الکتریکی مغز در طول مدت انجام فرادرمانی در میان جمعیت فرادمانگرها [۸] نشان داده شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر میدان شعوری فرادرمانی بر تکثیر SARS-CoV2 و فلاسک‌های کشت سلول آلوده به باکتری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

استفاده از میدان شعوری فرادرمانی

نمونه‌های مورد مطالعه تحت تاثیر میدان‌های شعوری بر اساس دستورالعمل ارائه شده در وبسایت مدیریت تحقیقات در حوزه‌ی میدان‌های شعوری قرار گرفتند. جزئیات بیشتر در بخش ملاحظات مشترک این شماره ارائه شده است. در این مطالعه، میدان شعوری فرادرمانی هم‌زمان با تلقیح ویروس به فلاسک‌های کشت سلولی اعمال شد.

آماده‌سازی ویروس و سلول

اثرات میدان شعوری فرادرمانی در کشت سلول Vero که ویروس SARS-CoV-2 به آن تلقیح شده بود مورد ارزیابی قرار گرفت و تکثیر و رشد ویروس SARS-CoV-2 ارزیابی شد.

جمع‌آوری و انتقال نمونه‌های بالینی COVID-19 مثبت

سه نمونه سوآپ از حفره‌های حلق و بینی بیماران با تشخیص COVID-19 مثبت طبق نتایج real-time PCR با Ct کم‌تر از ۲۰ در آزمایشگاه جمع‌آوری شد. سوآپ‌ها داخل سه میلی‌لیتر محیط

کشت بعدی در فریزر ۲۰- منتقل شدند.

نتایج

آماده سازی و تیتراسیون ویروس

یک نمونه ویروس با 1×10^6 TCID50/mL و تعداد کپی RNA 4×10^6 انتخاب شد و یک میلی لیتر از آن به هر یک از فلاسک های گروه تیمار با فرادمانی و گروه های کنترل اضافه شد.

نتایج کشت سلولی

تفاوت میان نتایج شمارش سلول و سرعت رشد بین گروه تست و کنترل معنادار نبود ($p \geq 0.05$).

تکثیر ویروس در کشت سلولی

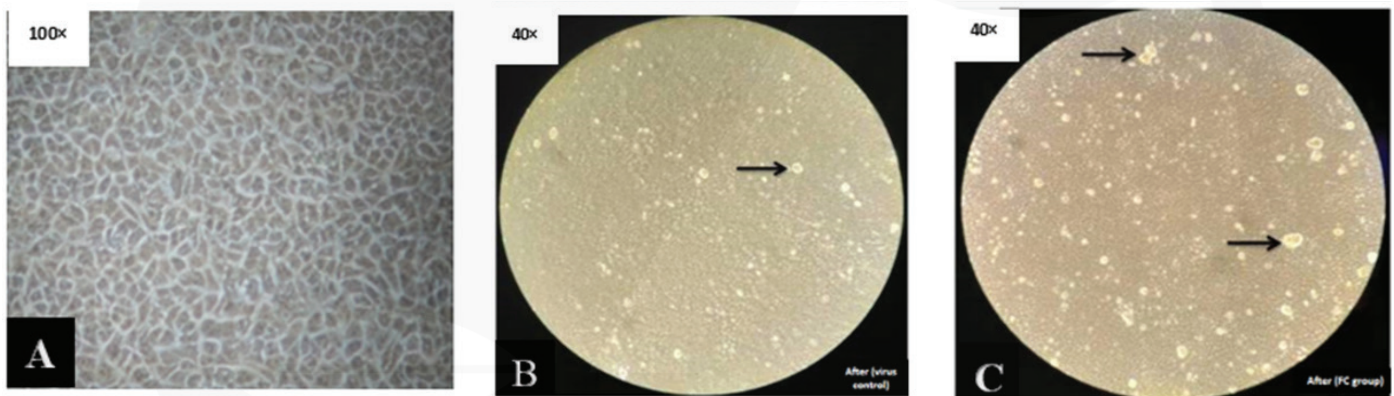
شکل ۱، CPEها را پس از شش روز کشت، بر سلول های Vero غیرآلوده (A)، کشت SARS-COV2 بدون اعمال اثر میدان شعوری فرادمانی (B) و با اعمال اثر میدان شعوری فرادمانی (C) نشان می دهد. در روش TCID50، تیتراژ ویروس در سلول های Vero آلوده در گروه های تحت تیمار میدان شعوری فرادمانی و گروه کنترل به ترتیب $10^{6/4}$ و $10^{7/5}$ برای فلاسک های کشت بود. این پدیده نشان می دهد تیتراژ ویروس افزایش قابل توجهی در فلاسک هایی که در آنها میدان شعوری فرادمانی اعمال شده بود، داشت ($p \leq 0.05$) (شکل ۱). همچنین، در میکروسکوپ معکوس، مناطق CPE بیش تری در گروه تست (میدان شعوری فرادمانی) مشاهده شد (شکل ۱C).

اثر میدان شعوری فرادمانی بر محیط کشت آلوده با باکتری

به موازات کشت ویروس، شش کشت سلولی جهت تلقیح آلودگی (کشت سلولی از پیش آلوده شده با باکتری *Bacillus spp*) در نظر گرفته شدند. در گروه تیمار با میدان شعوری فرادمانی، همزمان با اعلام فرادمانی 20 میکرولیتر (1×10^5 CFU/mL) مایع رویی فلاسک به طور مستقیم در سه فلاسک کشت سلول تلقیح شد. همچنین، سه فلاسک دیگر به عنوان کنترل تلقیح شدند. کشت ها از نظر تغییر در رنگ، کدورت، مرگ سلولی و سایر ویژگی های قابل مشاهده در طول سه روز و به طور روزانه بررسی شدند.

تحلیل آماری

داده ها در نسخه ی SPSS 21 با استفاده از t-test و تحلیل نرمال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p\text{-value} < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

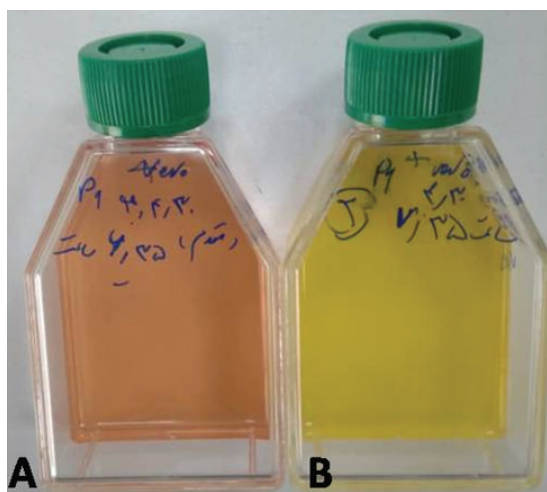


شکل ۱- A: سلول های Vero غیرآلوده، B: سلول های Vero آلوده به ویروس کرونا و C: سلول های Vero آلوده به ویروس کرونا با اعمال میدان شعوری فرادمانی که میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی $100 \times$ و $40 \times$ آن را نشان داده است. بعضی از CPEها (نقاط روشن، گرد و جدا شده و جمع شده) با فلش های سیاه نشان داده شده است.

فلاسک آلوده تحت اثر میدان شعوری فرادمانی (A) و فلاسک آلوده بدون اثر میدان شعوری فرادمانی (B) در شکل ۲ نشان داده شده است. تفاوت های قابل توجهی در رنگ، کدورت و زنده ماندن سلول های کشت شده Vero دیده شد. اگرچه در هر دو کشت آلودگی به وضوح دیده شد و سلول ها پس از ۱۸ ساعت کاملاً از کف فلاسک B و پس از ۴۸ ساعت از فلاسک A جدا شدند.

نتایج آلودگی محیط کشت سلول با باکتری

از فنل قرمز به عنوان نشان گر pH در محیط کشت سلول استفاده می شود (فنل دارای رنگ زرد در $pH=6.4$ یا پایین و رنگ قرمز در $pH=8.2$ و بالاتر خواهد بود). اسیدی شدن تدریجی (زرد شدن) نشانه ای از استفاده از گلوکز محیطی در کشت سلولی غیرآلوده است. به خصوص در آلودگی های باکتریایی، رنگ محیط به سرعت زرد شده، محیط کدر می شود؛ بدون این که سلول ها در فلاسک رشد کنند.



شکل ۲- نمونه‌های فلاسک کشت سلول T-25 آلوده پس از ۲۴ ساعت. A: فلاسک آلوده با تیمار میدان شعوری فرادرمانی، B: فلاسک آلوده و بدون تیمار میدان شعوری فرادرمانی (کنترل). تفاوت قابل توجهی در رنگ و کدورت محیط‌های کشت دو گروه مشاهده شد.

درباره‌ی سلول‌ها، میکرواگانسیسم‌ها و فرایندهای بیولوژیکی سوالات گوناگونی درباره‌ی رفتارها و عملکردهای TCFs مطرح می‌کند. اگرچه سازوکار فرادرمانی و سایر TCFs هنوز در دنیای علم قابل تعریف نیست اما بررسی اثرات آن‌ها بر موجودات گوناگون بیولوژیکی (و غیربیولوژیکی) برای درک ماهیت و میزان اثرات مفید و قابلیت‌های درمانی آن‌ها مهم است. نتایج این مطالعه تغییر قابل مشاهده‌ای در رفتار سلول‌های آلوده به باکتری نشان داد. برای بررسی اثرات میدان شعوری فرادرمانی بر SARS-CoV-2 به منظور کشف طیف کامل و تمام جنبه‌های روش درمان با TCFs مطالعات بیش تری مورد نیاز است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در آزمایشگاه تخصصی ویروس‌شناسی کیوان (KVSL) در تهران انجام شده است. ما از اعضای این آزمایشگاه برای کمک در انجام آزمایش‌ها تشکر می‌کنیم.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی اعلام نکردند.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر به روشنی نشان داد میدان شعوری فرادرمانی اثرات فزاینده‌ای در رشد و تکثیر ویروس در کشت سلولی و همچنین محافظت از سلول Vero در برابر آلودگی باکتریایی داشت. در کشت ویروس، فرادرمانی باعث افزایش تکثیر و رشد ویروس شد. در عین حال، سلول‌ها ماندگاری بیش تر و توانایی مقاومت در برابر شرایط سخت علیه ویروس را داشتند.

اغلب آزمایشگاه‌های ویروس‌شناسی معمول، به منظور محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات مخرب آلودگی باکتریایی به محیط کشت سلول آنتی‌بیوتیک اضافه می‌کنند [۱۰، ۱۱]. کشت سلولی تلقیح‌شده با نمونه‌های بالینی برای جداسازی ویروس به دلیل رشد بیش از حد باکتری‌ها علی‌رغم وجود آنتی‌بیوتیک کارایی خود را از دست می‌دهد [۱۲]. در این مطالعه اثر میدان شعوری فرادرمانی در آلودگی باکتریایی کشت سلولی بررسی شد. به نظر می‌رسد میدان شعوری فرادرمانی مانع رشد باکتری‌ها بر محیط کشت سلولی می‌شود. برای بررسی‌های بیش تر درباره‌ی سازوکار و چه‌گونه‌ی عملکرد میدان‌های شعوری در آزمایشگاه نیاز به تحقیقات بیش تری روی انواع محیط‌های کشت با انواع گوناگون باکتری‌ها است. تحقیق

منابع

- Al-Tawfiq, J. A. (2020). Viral loads of SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 in respiratory specimens: What have we learned? *Travel Medicine and Infectious Disease*, 34, 101629. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101629>
- Liu, S.-L., & Saif, L. (2020). Emerging viruses without borders: The Wuhan coronavirus. *Viruses*, 12(2), 130. <https://doi.org/10.3390/v12010130>
- Taheri, M. A. (2013). *Human from another outlook* (2nd ed.). Interuniversal Press. ISBN: 9781939507006
- Taheri, M. A., Semsarha, F., Mahdavi, M., Afsartala, Z., & Amani, L. (2020). The influence of the Faradarmani consciousness field on the survival and death of MCF-7 breast cancer cells: An optimization perspective. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3705537>

5. Taheri, M. A., Torabi, S., Nabavi, N., & Semsarha, F. (2021). Influence of Faradarmani consciousness field (FCF) on spatial memory and passive avoidance behavior of scopolamine model of Alzheimer disease in male Wistar rats. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3761188>
6. Torabi, S., Taheri, M. A., & Semsarha, F. (2020). Alleviative effects of Faradarmani consciousness field on *Triticum aestivum* L. under salinity stress. *F1000Research*, 9, 1089. <https://doi.org/10.12688/f1000research.25247.4>
7. Taheri, M. A., Zarrini, G., Torabi, S., Nabavi, N., & Semsarha, F. (2021). Influence of Faradarmani consciousness field on bacterial population growth. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.08.426007>
8. Taheri, M. A., Semsarha, F., & Modarresi-Asem, F. (2020). An investigation on the electrical activity of the brain during Faradarmani connection in the Fara-therapist population. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.20944/preprints202009.0679.v1>
9. Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
10. Cruickshank, C., & Lowbury, E. (1952). Effect of antibiotics on tissue cultures of human skin. *British Medical Journal*, 2(4793), 1070–1072. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4793.1070>
11. Leifert, C., & Cassells, A. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37(2), 133–138. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0025-y>
12. Gray, J., & Brenwald, N. (1991). The use of antibiotics to control bacterial overgrowth of cell cultures used for diagnostic virology. *Journal of Virological Methods*, 32(2–3), 163–170. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90047-4)