تاثیـــر میدان‌هـــای شـــعوری طاهـــری بـــر بقـــا و عفونت‌زایـــی ویـــروس SARS-CoV-2 درpH هـــای مختلـــف

محمدعلی طاهری[1]، لاله امانی[2]، سیمین شریفی[3]، احمد خلیلی[4]، حسین کیوانی[5*]

۱. بخش تحقیق و توسعه‌ی ساینسفکت، مرکز تحقیقات کازموانتل ، 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

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

DOI:https://doi.org/10.61450/joci.FA.v1i1.82

چکیده

ویـروس کرونـا (SARS-CoV-2) کـه از سـال ۲۰۱۹ باعـث بیمـاری کرونـا (COVID-19) شـده در سـطح جهانـی بـه مشـکل جـدی بهداشـت عمومـی تبدیـل شـده اسـت. مطالعـات نشـان دادهpH محیـطْ فاکتـور مهمـی بـرای ورود ایـن ویـروس بـه سـلول‌ها و هم‌جوشـی پوشـش آن بـا غشـای سـلول‌های میزبـان اسـت. میدان‌هـای شـعوری طاهـری (TCFs) کـه محمدعلـی طاهـری آن‌هـا را معرفـی کـرده، میدان‌هـای جدیـدی هسـتند کـه نـه ماده‌انـد و نـه انـرژی. بنابرایـن، غیرقابـل سـنجش‌اند و نمی‌تـوان آن‌هـا را به‌طـور مسـتقیم مشـاهده یـا اندازه‌گیـری کـرد. بـا ایـن حـال، اثبـات و اندازه‌گیـری اثـرات ایـن میدان‌هـا از طریـق آزمایش‌هـای علمـی اسـتاندارد امکان‌پذیـر اسـت. ایـن مطالعـه بـا هـدف بررسـی اثـرات دو میـدان شـعوری ۱ و ۲ بـر بقـا و عفونت‌زایـی ویـروس کرونـا درpH هـای مختلـف انجـام شـد. ویـروس (1×10^6 TCID50) بـه مـدت یـک روز در معـرض pHهـای مختلـف (pH: 2-12) در دمـای اتـاق قـرار گرفـت. بـرای ارزیابـی بقـا و عفونت‌زایـی ویـروس از تسـت‌های CPE (اثـر سـیتوپاتیک) و TCID50 اسـتفاده شـد. نتایـج نشـان داد میدان‌هـای شـعوری، ویـروس کرونـا را در pHهـای ۴، ۹.۵ و ۱۱ به‌طـور کامـل غیرفعـال کردنـد و در pHهـای ۶، ۷.۲ و ۸.۵ تیترهـای ویروسـی را بـه میـزان قابـل توجهـی کاهـش دادنـد. ایـن یافته‌هـا نشـان می‌دهـد میدان‌هـای شـعوری بـه عنـوان مداخلـه‌ای کیفـی، پتانسـیل غیرفعال‌کـردن ویـروس کرونـا را دارنـد. بـا وجـود ایـن، بـرای روشن‌شـدن سـازوکارهای اساسـی کـه میدان‌هـای شـعوری از طریـق آن‌هـا بـر بقـا و عفونت‌زایـی ویـروس تاثیـر می‌گذارنـد، مطالعـات بیش‌تـری مـورد نیـاز اسـت.

کلیدواژه‌ها: میدان‌های شعوری طاهری، شعور(ط)، COVID-19، ویروس کرونا، pH

مقدمه

ظهـور بیمـاری کرونـا ویـروس ۲۰۱۹ (COVID-19) در چیـن و گسـترش سـریع آن، بـه وضعیتـی اضطـراری بـرای سـلامت جهانـی تبدیـل شـده اسـت [۱]. عوامـل مرتبـط بـا اکوسیسـتم ماننـدPH ، دمـا، مـواد ضدعفونی‌کننـده، اشـیا، غـذا و... نقـش مهمـی در میـزان زنده‌مانـدن ویـروس کرونـا در خـارج از بـدن و محیـط آزمایشـگاه دارنـد. عـلاوه بـر ایـن، مطالعـات نشـان داده PH عامـل مهمـی بـرای هم‌جوشـی پوشـش ویـروس بـا غشـای سـلول‌های میزبـان و ورود بـه سـلول‌ها اسـت [۲]. اتصـال ویـروس کرونـا بـه ACE2 (آنزیـم مبـدل آنژیوتانسـین ۲) در pH سـیتوزولی پاییـن آسـان‌تر اسـت [۳].

در قـرن حاضـر، ماهیـت شـعور و جایـگاه آن در دنیـای علـم بسـیار مـورد توجـه قـرار گرفتـه و نظریه‌هـای فلسـفی و علمـی بسـیاری در ایـن زمینـه ارائـه شـده اسـت. محمدعلـی طاهـری در دهـه‌ی ۱۹۸۰، میدان‌هـای جدیـدی بـا ماهیـت غیرمـادی و غیرانرژیایـی معرفـی کـرده اسـت کـه میدان‌هـای شـعوری طاهـری (TCFs) نامیـده می‌شـوند. ایـن میدان‌هـا کـه عملکردهـای متنـوع دارنـد، زیرمجموعـه‌ی شـبکه‌ی شـعور کیهانـی هسـتند. ایـن امـکان وجـود دارد کـه بـا اعمـال میدان‌هـای شـعوری بـر موجـودات زنـده و غیرزنـده همچـون گیاهـان، حیوانـات، میکروارگانیسـم‌ها، مـواد و غیـره اثـرات آن‌هـا را بررسـی کـرد [۴]. ایـن ویژگـی بررسـی عملیاتـی، محققـان را بـر آن داشـته کـه بـا طراحـی آزمایش‌هـای متعـدد بـه ثبـت اثـرات ایـن میدان‌هـای غیرفرکانسـی بپردازنـد.

در تحقیقـات قبلـی تاثیـر میدان‌هـای شـعوری بـر رده‌ی سـلول‌های سـرطانی MCF7 [۵]، حافظـه‌ی فضایـی و رفتـار اجتنابـی مـدل مـوش صحرایـی بـا بیمـاری آلزایمـر [۶]، گیـاه گنـدم [۷]، رشـد جمعیـت باکتریایـی [۸] و فعالیـت الکتریکـی مغـز در طـول فرادرمانـی در جمعیـت فرادرمانگرهـا [۹] مـورد بررسـی قـرار گرفتـه اسـت. ایـن مطالعـه بـا هـدف بررسـی اثـرات دو میـدان شـعوری ۱ و ۲ بـر بقـا و عفونت‌زایـی ویـروس کرونـا درpH هـای مختلـف انجـام شـد. ویـروس بـه مـدت یـک روز در شـرایط مختلـفpH (pH: 2-12) در دمـای اتـاق قـرار گرفـت. CPE (اثـر سـیتوپاتیک) و TCID50 بـرای ارزیابـی بقـا و عفونـت زایـی ویـروس اسـتفاده شـد.

مواد و روش‌ها

کاربرد میدان‌های شعوری

نمونه‌هـای مـورد مطالعـه بـر اسـاس دسـتورالعمل ارائه‌شـده در وب‌سـایت مدیریـت تحقیقـات در حـوزه‌ی میدان‌هـای شـعوری تحـت تاثیـر ایـن میدان‌هـا قـرار گرفتنـد. جزییـات بیش‌تـر در بخـش ملاحظـات مشـترک ایـن شـماره ارائـه شـده اسـت. در مطالعـه‌ی حاضـر، میدان‌هـای شـعوری، دقیقـا هم‌زمـان بـا تلقیـح ویـروس در فلاسـک‌های کشـت سـلولی در گروه‌هـای آزمایشـگاهی تیمـار بـا میدان‌هـای شـعوری ۱ و ۲ بـر نمونه‌هـا اعمـال شـد.

کشت سلول‌های Vero و ویروس کرونا

آماده‌سازی سلول‌هایVero

رده‌ی سـلولی Vero در یـک فلاسـک T-75 بـا ۱۰% سـرم جنیـن گاوی (Gibco) و ۹۰% محیـط DMEM (Gibco) کشـت داده شـد و در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سـانتی‌گراد و 5٪ CO_2 انکوبـه شـد [۱۰].

جداسازی و کشت ویروس

SARS-CoV-2 از نمونه‌هـای بیمـاران COVID-19 مثبـت بـر اسـاس آنالیـز real-time PCR آن‌هـا جـدا شـد (Ct: 10). تمـام آزمایش‌هـا در آزمایشـگاه ایمنـی زیسـتی درجـه‌ی سـه انجـام شـد [۱۱]. تکثیـر SARS-CoV-2 و سـنجش TCID50 صـورت گرفـت. سـلول‌ها و ویروس‌هـا در پلیـت ۹۶ چاهکـی کشـت داده شـدند و روش Reed–Muench بـرای سـنجش و ارزیابـی TCID50 اسـتفاده شـد [۱۲]. سـرانجام، بـر اسـاس تجزیه‌وتحلیـل نتایـج، کشـت ویـروس بـا TCID50/mL بـا لگاریتـم شـش و مقـدار Ct 11 بـرای تلقیـح انتخـاب شـد.

تاثیر میدان‌های شعوری تحت pHهای مختلف بر بقا و عفونت‌زایی ویروس کرونا

محیـط VTM (محیـط انتقـال ویروسـی) بـاpH هـای مختلـف از ۲ تا ۱۱ بـا اسـتفاده از اسـید کلریدریـک (5M و 1M HCL) و هیدروکسیدسـدیم (1N NaOH) بـر اسـاس دسـتورالعمل‌های بین‌المللـی تهیـه شـد. سـپس از سوسپانسـیون مایـع رویـی کشـت ویـروس کرونـا بـا تیتـر 10^6~TCID50/mL بـه فالکون‌هـای VTM اضافـه و در دمـای اتـاق (۲۵-۲۰ درجـه‌ی سـانتی‌گراد) انکوبـه شـد. بـرای هـر pH، سـه تکـرار در نظـر گرفتـه شـد و هـر نمونـه نیـز بـه دو گـروه میدان‌هـای شـعوری و گـروه کنتـرل (عـدم اعمـال میـدان هـای شـعوری) تقسـیم شـد. بقـا و عفونت‌زایـی تـا یـک روز پـس از تلقیـح اندازه‌گیـری شـد. تیتـر ویـروس بـه روش TCID50 محاسـبه شـد [۱۲].

تغلیظ ویروس

در ایـن مطالعـه بـرای تغلیـظ ویـروس از روش رسـوب پلی‌اتیلن‌گلیکـول (PEG) بـرای از بیـن بـردن عوامـل سیتوتوکسـیک محیـط کشـت سـلولی یـا بازدارنده‌هـای PCR اسـتفاده شـد. نمونه‌هـا بـا محلـول PEG-6000 مخلـوط شـدند. سـپس بـه مـدت هشـت سـاعت در ۱۵۰ دور در دقیقـه در دمـای چهـار درجـه‌ی سـانتی‌گراد هـم زده شـده و مایـع رویـی بـه مـدت ۵۰ دقیقـه در 3600g سـانتریفیوژ شـد. مایـع رویـی حـاویPEG برداشـته شـد و رسـوب حاصـل در یـک میلی‌لیتـر محلـول بافـر فسـفات (PBS) حـل و دوبـاره بـه مـدت ۴۰ دقیقـه در 4000g سـانتریفیوژ شـد. مایـع رویـی از طریـق فیلتـر غشـایی اسـتریل ۰٫۲ میکرومتـر فیلتـر و ۵۰ میکرولیتـر آن بـه چاهک‌هـای ۹۶تایـی اضافـه شـد. سـپس بـرای اسـتفاده TCID50 در 5٪ CO_2 و 37 °C انکوبـه شـد. چاهک‌هـا هـر ۲۴ سـاعت از نظـر CPE (اثـر سـیتوپاتیک) کنتـرل شـدند و نتایـج پـس از شـش روز گـزارش شـد [۱۳].

1. www.COSMOintel.com

تحلیل آماری داده ها

داده‌هـا از طریـق نرم‌افـزار SPSS نسـخه‌ی ۲۶ بـا سـطح اطمینـان ۹۵٪ مـورد تجزیه‌وتحلیـل قـرار گرفتنـد. از آزمـون آنالیـز ANOVA بـرای تشـخیص اختـلاف معنـادار بیـن نمونه‌هـا اسـتفاده شـد.

نتایج

نتایـج اسـتفاده از تاثیـر هم‌زمـان دو میـدان شـعوری ۱ و ۲ بـر ویـروس کرونـا تحـتpH هـای مختلـف در جـدول ۱ نشـان داده شـده اسـت. ویـروس در pH هـای ۲ و ۱۲ در هـر دو گـروه تیمـار و کنتـرل مشـاهده نشـد. همچنیـن، میدان‌هـای شـعوری ویـروس را درpH هـای ۴، ۱۱ و ۹/۵ کامـلا از بیـن بردنـد. در حالـی کـه ویـروس در ایـن pHهـا در گـروه کنتـرل فعـال بـود. همچنیـن، میدان‌هـای شـعوری درpH هـای ۶، ۷/۲ و ۸/۵ به‌طـور قابـل توجهـی باعـث کاهـش تیتـر ویـروس در مقایسـه بـا گـروه کنتـرل شـدند ($p<0.05$).

جدول ۱. اعمال اثر میدان‌های شعوری بر تیتر ویروس کرونا تحت pHهای مختلف

No.	pH	تیتر ویروس		
		نمونه‌ی اولیه	گروه کنترل	میدان‌های شعوری
1	2	1×10^{6}	ND	ND
2	4	1×10^{6}	$1 \times 10^{3.3}$	ND
3	6	1×10^{6}	1×10^{5}	$1 \times 10^{3.5*}$
4	7.2	1×10^{6}	$1 \times 10^{5.2}$	$1 \times 10^{4.1*}$
5	8.5	1×10^{6}	$1 \times 10^{4.6}$	$1 \times 10^{3*}$
6	9.5	1×10^{6}	$1 \times 10^{3.5}$	ND
7	11	1×10^{6}	1×10^{3}	ND
8	12	1×10^{6}	ND	ND

ND (عدم ردیابی ویروس). ستاره (*) تفاوت معناداری ($p<0.05$) را بین گروه‌های درمان TCF و کنترل نشان می‌دهد.

بحث

مطالعـات قبلـی نشـان داد عفونت‌زایـی ویروس‌هـای کرونـا تحـت تاثیـر تغییـرات pH و دمـا قـرار دارد [۱۴]. یکـی از مراحـل مهـم بـرای ورود ویـروس بـه سـلول‌ها، آمیختگـی پوشـش آن بـا غشـای سـلول‌های میزبـان اسـت [۲]. pH خنثـی و کمـی اسـیدی بـرای هم‌جوشـی SARS-CoV-2 و نفـوذ بـه سـلول‌های هـدف میزبـان و اثـر متقابـل گلیکوپروتئیـن اسـپایک بـا گیرنـده‌ی ACE2 بهینـه اسـت [۱۵، ۱۶]. نتایـج مـا نشـان داد بقـای SARS-CoV-2 وابسـته بـه pH اسـت و در شـرایط اسـیدی یـا قلیایـی شـدید، حداقـل بقـا را دارد. در مقادیـر pH متوسـط، وجـود میدان‌هـای شـعوری تیترهـای ویروسـی را در مقایسـه بـا گـروه کنتـرل بـه طـور معنـی‌دار کاهـش دادنـد کـه ایـن نشـان‌دهنده‌ی اثـرات ضدویروسـی بالقـوه اسـت. بـا ایـن حـال، بـرای درک بهتـر اثـرات میدان‌هـای شـعوری در شـرایط مختلـف، مطالعـات بیش‌تـری لازم اسـت.

تقدیر و تشکر

ایـن مطالعـه در آزمایشـگاه تخصصـی ویروس‌شناسـی کیـوان (KVSL) در تهـران انجـام شـد. مـا از اعضـای ایـن آزمایشـگاه بـرای کمـک در انجـام آزمایش‌هـا تشـکر می‌کنیـم.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی اعلام نکردند.

منابع

1. Ciotti, M., Angeletti, S., Minieri, M., Giovannetti, M., Benvenuto, D., Pascarella, S., Sagnelli, C., Bianchi, M., Bernardini, S., & Ciccozzi, M. (2019). COVID-19 outbreak: An overview. *Chemotherapy, 64*(5–6), 215–223. https://doi.org/10.1159/000507423

2. Earp, L., Delos, S., Park, H., & White, J. (2004). The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. In E. Wimmer (Ed.), *Membrane trafficking in viral replication* (pp. 25–66). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8153-9_2

3. Cure, E., & Cure, C. (2020). Comment on "Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19." *Journal of Medical Virology, 92*(11), 1423–1424. https://doi.org/10.1002/jmv.25848

4. Taheri, M. A. (2013). *Human from another outlook* (2nd ed.). Interuniversal Press. ISBN: 9781939507006

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. Taheri, M. A., Semsarha, F., & Modarresi-Asem, F. (2020). An investigation on the electrical activity of the brain during Fara-Darmani connection in the Fara-therapist population. *SSRN Electronic Journal.* https://doi.org/10.20944/preprints202009.0679.v1

10. Rosenke, K., Leventhal, S., Moulton, H. M., Hatlevig, S., Hawman, D., Feldmann, H., & Stein, D. A. (2021). Inhibition of SARS-CoV-2 in Vero cell cultures by peptide-conjugated morpholino oligomers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76*(2), 413–417. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa460

11. World Health Organization. (2020). *Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): Interim guidance, 12 February 2020.* World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138

12. Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology, 27*(3), 493–497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

13. Norouzbeigi, S., Yekta, R., Vahid-Dastjerdi, L., Keyvani, H., Ranjbar, M. M., Shadnoush, M., Yousefi, M., Khorshidian, N., Sohrabvandi, S., & Mortazavian, A. M. (2021). Stability of SARS-CoV-2 as a consequence of heating and microwave processing in meat products and bread. *Food Science & Nutrition, 9*(9), 5146–5152. https://doi.org/10.1002/fsn3.2481

14. Lamarre, A., & Talbot, P. J. (1989). Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. *Canadian Journal of Microbiology, 35*(10), 972–974. https://doi.org/10.1139/m89-160

15. Gallagher, T. M., & Buchmeier, M. J. (2001). Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology, 279*(2), 371–374. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0757

16. Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., & Daniel, S. (2020). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Research, 178,* 104792. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792