

تأثیر میدان شعوری فرادرمانی بر پاسخ ایمنی القا شده ناشی از واکسن غیرفعال ویروس تب برفکی در رت و تکثیر ویروس در شرایط آزمایشگاهی

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

خلاصه

یکی از مهمترین خطرهایی که صنعت دام کشورها را در سراسر دنیا تحت تأثیر قرار می‌دهد بیماری تب برفکی است. واکسن‌های تجاری تب برفکی که در حال حاضر در دسترس هستند، محدودیت‌های زیادی مانند القای کند و نگهداری کوتاه مدت تیت‌های آنتی بادی دارند. بنابراین، یک روش جدید مورد نیاز است که بتواند تیت‌های آنتی بادی خنثی کننده زیادی را ایجاد کند تا از میزبان در مراحل اولیه عفونت ویروس تب برفکی محافظت کند و تیت‌های بالای آنتی بادی را برای مدت طولانی پس از یک دوز واکسیناسیون حفظ کند. میدان‌های شعوری (ط) بسیاری وجود دارند که توسط محمد علی طاهری معرفی شده است. میدان‌های شعوری (ط) نه ماده و نه انرژی هستند و به طور مستقیم قابل ارزیابی نیستند. با این حال، ما می‌توانیم اثرات آنها را به طور غیر مستقیم از طریق آزمایشات تکرار پذیر در آزمایشگاه ارزیابی کنیم. هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر میدان شعوری فرادرمانی بر تکثیر، تیت و تعداد کپی RNA ویروس تب برفکی و همچنین پاسخ ایمنی هومورال در برابر دو نوع واکسن ویروس غیرفعال تب برفکی با ادجوانت‌های مختلف در رت می‌باشد. دو نوع واکسن تب برفکی با ادجوانت‌های مختلف (فروند و آلوم) تهیه شد و سپس ۳۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با واکسن ایمن شدند. موش‌ها به ۶ گروه با پنج عضو تقسیم شدند و چهار گروه از موش‌ها تحت تیمارهای مختلف قرار گرفتند و دو گروه به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. فواصل واکسیناسیون هر ۱۴ روز و سه بار بود. برای ارزیابی تغییرات سطح آنتی بادی در نمونه‌های سرم، رت‌ها پس از هر واکسیناسیون از آزمون خنثی سازی سرم و الیزا استفاده شد. نتایج نشان داد که میدان شعوری فرادرمانی باعث افزایش تکثیر ویروس در شرایط آزمایشگاهی شد. علاوه بر این، سطوح آنتی بادی در گروه‌های تیمار با هر دو گروه واکسن ادجوانت فروند و آلوم نسبت به گروه بدون تیمار فرادرمانی افزایش یافت. در نتیجه، داده‌های این آزمایش پیشنهاد می‌کند که فرادرمانی ممکن است بطور موثری باعث افزایش موفقیت در ایمن سازی واکسیناسیون علیه ویروس تب برفکی سروتیپ O داشته باشد. توصیه می‌شود تأثیرات میدان‌های شعوری (ط) بر انواع مختلفی از واکسن‌ها بررسی گردد.

۱. بخش تحقیق و توسعه ساینس‌فکت، مرکز تحقیقات Cosmointel Inc.، انتاریو، کانادا

۲. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات زیست پزشکی سرطان، تهران، ایران

۴. گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

* نویسنده مسئول:

حسین کیوانی، گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: Keyvanlab@yahoo.com

** سرکارخانم دکتر لاله امانی از محققین خوب، دلسوز و پرا انرژی در حوزه تحقیقات کارموبانتل بودند که به رحمت خدا رفته اند. ضمن تقدیر و قدردانی از زحمات بسیار زیاد ایشان در این زمینه، برایشان طلب مغفرت داریم.

مقدمه

یکی از بیماری‌های ویروسی بسیار مسری، بیماری تب برفکی (FMD) است که دام‌های سم دار را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با کاهش شدید در بهره‌وری از این حیوانات، انتقال سریع و مرگ و میر زیاد در حیوانات تازه متولد شده ناشی از میوکاردیت، خسارات مالی زیادی در صنعت دام ایجاد می‌کند (۱). این بیماری با تب شدید همراه است و باعث ایجاد وزیکول در دهان، زبان، بینی، پوزه، سم، نوک پستان و سایر قسمت‌های بدون موی پوست حیوان می‌شود (۲). ویروس بیماری تب برفکی (FMDV) عامل ایجاد کننده تب برفکی است که یک ویروس RNA دار تک رشته‌ای، با پولاریته مثبت و متعلق به جنس آفتوویروس از خانواده پیکورنا ویریده است. هفت سروتیپ متمایز SAT1، SAT2، SAT3 و A، O، C، Asia1، رایج‌ترین سروتیپ از این ویروس وجود دارد (۳). رایج‌ترین سروتیپ این ویروس سروتیپ O است که در چندین نقطه جهان شایع است (۴). سروتیپ‌های این ویروس درجه بالایی از تغییرات آنتی ژنی و ژنتیکی را نشان می‌دهند، به طوری که تولید آنتی بادی تحریک شده توسط یک سروتیپ نمی‌تواند در برابر سروتیپ‌های مختلف موثر باشد و واکسیناسیون محافظت متقابل را ایجاد نمی‌کند (۵، ۶). بنابراین، سویه‌های واکسن برای هر نوع باید تهیه و برای محافظت در برابر هر سروتیپ و توپوتیپ استفاده شود. علاوه بر این، برای حفظ تیتراژ آنتی بادی، تزریق واکسن بطور مداوم تکرار شود. با این وجود، این روش‌ها وقت گیر بوده و اثر این واکسن‌ها همچنان نامشخص است. در حالی که سیاست واکسیناسیون برای پیشگیری و درمان تب برفکی اعمال شده است، اما محدودیت‌های بیشمار برای واکسن‌های FMD موجود در بازار وجود دارد (۷-۹). برخی از محدودیت‌ها شامل نیاز به واکسیناسیون مکرر و منظم، نیاز به مدت طولانی برای ایجاد سطح محافظتی از آنتی بادی‌های واکسن، تیتراژ آنتی بادی

کم و کوتاه مدت، محافظت ناکافی از میزبان فقط با پاسخ ایمنی هومورال می‌باشد. بنابراین، برای غلبه بر محدودیت‌های فعلی واکسن‌های تب برفکی و افزایش کارایی آنها، روش‌های جدیدی لازم است (۱۰). 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 (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 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 مد نظر 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

۱. منظور از میدان‌های شعوری (ط) همان میدان‌های شعوری طاهری است.



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 می‌شود. ذهن انسان نقشی واسطه (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 می‌گردد. این میدان‌ها مستقیماً قابل اندازه‌گیری توسط علم نیستند، اما می‌توان اثرات آنها را بر موضوعات مختلف از طریق آزمایش‌های تکرار پذیر بررسی کرد (۱۱).

پایه ریزی 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.

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر میدان شعوری فرادرمانی بر تکثیر ویروس FMD، تیترو تعداد کپی RNA و همچنین پاسخ ایمنی هومورال در برابر دو نوع واکسن FMD با مواد ادجوانت مختلف در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

روش استفاده از میدان‌های شعوری (ط)

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. درخواست نظر و ارتباط برای همگان رایگان می‌باشد. به منظور تجربه میدان‌های شعوری (ط) و انجام پژوهش در این زمینه، در هر زمانی و در هر مکانی، محققین پس از ثبت نام در وب سایت ذکر شده، بعضی از مشخصات آزمایش مورد نظر را به مرکز راهنما گزارش می‌نمایند. برای مثال، شماره نمونه‌ها، کنترل و نام قراردادی آنها باید مشخص گردد. 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. دو سو کور یک استاندارد

استخراج RNA ویروسی و واکنش Real-time RT-PCR

RNA کل نمونه‌ها بر اساس دستورالعمل توسط کیت (Roche) High Pure Viral RNA استخراج شد. واکنش Real-time RT-PCR توسط کیت یک مرحله‌ای (Invitrogen) Superscript III/Platinum Taq انجام شد. از یکسری پرایمرها برای تشخیص قطعه FMDV 3D (ژن RNA پلیمراز) استفاده شد. حجم کل ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی ۰/۴ میکرولیتر $MgSO_4$ ، ۱۰ میکرولیتر بافر واکنش -x2، ۲/۶ میکرولیتر آب دی اتیل پیروکربنات DEPC، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Superscript III/Platinum، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۱ میکرولیتر پروب، ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده بود، سپس تیوبها در دستگاه Corbett Rotor-Gene قرار گرفتند. مراحل واکنش در چرخه‌های دمایی زیر انجام شد: رونویسی معکوس (یک سیکل)، ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه، دناتوراسیون اولیه (یک سیکل)، ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۲ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه (۴۰ سیکل).

تهیه آنتی ژن کامل ویروس FMD برای واکنش‌ها

هر فلاسک سلول BHK (کانفلونسی ۸۰٪) با ۲ میلی لیتر ویروس ($10^{6.8}$ TCID50/ml) تلقیح شد. بعد از ۱۸ ساعت، تمام فلاسکها اثر سیتوپاتیک کامل (CPE) را نشان دادند. فلاسکهای حاوی سلول و ویروس سپس در دمای منفی ۷۰ درجه سانتیگراد منجمد شده و دو بار ذوب شدند تا سلولها از بین بروند و ویروسهای داخل سلول خارج شوند. در مرحله بعد، سوسپانسیون حاصل از طریق فیلتر ۰/۲ میکرومتر فیلتر شد. سوسپانسیون ویروسی (۵۰۰ میلی لیتر) در دور $3000 \times rmp$ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. غیرفعال سازی ویروس توسط binary ethylenimine با غلظت ۵ میلی مولار به مدت ۲۴ ساعت در ۲۵

در آزمایش‌های علمی در زمینه پزشکی و روانشناسی که شامل تست‌های نظری و عملی است، رایج است و این مطالعه به صورت دو سو کور انجام شده است.

در مطالعه حاضر، میدان شعوری فرادمانی دقیقاً همزمان با تزریق واکنش برای گروه‌های تیمار حیوانات و همچنین همزمان با تلقیح ویروس در فلاسک‌های کشت سلولی در گروه‌های تیمار آزمایشگاهی اعلام شد.

تکثیر ویروس FMD

ویروس FMD سروتیپ O (سروتیپ O FMDV) از موسسه پیربرایت تهیه شده و در این پروژه مورد استفاده قرار گرفت. رده سلول BHK (کلیه نوزاد همستر) در DMEM با گلوکز بالا، ۵٪ FBS، ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر پنی سیلین و استریتومایسین کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شد. به دنبال کانفلونسی ۸۰٪ کشتهای تک لایه سلول BHK در فلاسکهای T-25، ۰/۵ میلی لیتر از ویروس با 10^7 TCID50 به فلاسک‌های تیمار با میدان شعوری فرادمانی و کنترل تلقیح شد. هر روز اثر سیتوپاتیک (CPE) به مدت ۴۸ ساعت در زیر میکروسکوپ معکوس ثبت شد. پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها برای تست Real-time-PCR استفاده شدند. همه مراحل در آزمایشگاه ایمنی زیستی سطح ۳ (BSL-3) انجام شد.

تیتراسیون ویروس

میکروپلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه برای تعیین تیتراسیون ویروسی (10^{-5} تا رقت 10^{-9}) با استفاده از روش Reed & Muench (۱۲) استفاده شد. سپس، پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. فلاسک‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفتند تا از نظر اثرات سیتوپاتیک کنترل شوند.



درجه سانتیگراد انجام شد و ethyleneamine باقی مانده توسط تیو سولفات سدیم (۵ میلی مولار) خنثی شد. از پلی اتیلن گلیکول (w/v, 6000 kDa 8%) برای تغلیظ ویروس غیرفعال استفاده شد. نهایتاً، آنتی ژن تهیه شده در حجم ۱۰ میلی لیتر جمع آوری شد. غلظت آنتی ژن آماده شده ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود که با روش Lowry تعیین شد (۱۳).

آماده سازی واکسن

واکسن حاوی ژل هیدروکسید آلومینیوم

در تهیه محلول واکسن، ۳۳٪ ژل هیدروکسید آلومینیوم با pH ۷/۲ و ساپونین (۶ میلی گرم در دوز) استفاده شد.

واکسن حاوی ادجوانت فروند

برای تهیه واکسن حاوی ادجوانت فروند، از دو نوع ادجوانت کامل و ناقص (شرکت سیگما) استفاده شد. در ترکیب این واکسن، ۵۰٪ آنتی ژن با ۵۰٪ ادجوانت فروند مخلوط شد. همگن سازی واکسن با سرنگ ۱۰ میلی لیتر با پر شدن و تخلیه پی در پی انجام شد. در تزریق اول، واکسن حاوی فروند کامل و در تزریقات بعدی، واکسن حاوی ادجوانت ناقص فروند استفاده شد.

گروه بندی موش ها

در این مطالعه، از ۳۰ رت نر نژاد ویستار با وزن به طور متوسط حدود ۳۰۰ گرم استفاده شد. موش ها به ۶ گروه تقسیم شدند، پنج موش در هر گروه. به صورت زیر جلدی، ۰/۵ میلی لیتر از واکسن به هر رت در ناحیه بین دو شانه تزریق شد. ۵ رت به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند. گروه بندی به شرح زیر انجام شد:

گروه ۱: FMDV (سروتیپ O) + ادجوانت آلوم

گروه ۲: FMDV (سروتیپ O) + ادجوانت آلوم + میدان شعوری فرادرمانی

گروه ۳: FMDV (سروتیپ O) + ادجوانت فروند

گروه ۴: FMDV (سروتیپ O) + ادجوانت فروند + میدان شعوری فرادرمانی

گروه ۵: آلوم + VP۱ نوترکیب (کنترل مثبت)

گروه ۶: کنترل منفی

فواصل واکسیناسیون هر ۱۴ روز بود. نمونه خون در روز صفر و قبل از هر دوز ایمن سازی گرفته شد. نمونه های خون با سرعت کم (۱۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد) سانتریفیوژ شدند و سرم آنها جدا شد. سرم ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد انکوبه شدند تا کمپلمان آنها غیرفعال شود. سپس تا زمان انجام آزمایشات سرولوژی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایشات سرولوژی

برای ارزیابی تغییرات سطح آنتی بادی در نمونه های سرم رت پس از واکسیناسیون، از آزمون خنثی سازی سرم (SN) و الیزا استفاده شد.

تست SN

در ابتدا، سرم ها با محیط RPMI بطور سریالی رقیق شدند و ۵۰ میکرولیتر از هر رقت در هر چاهک به صورت دوبار تکرار ریخته شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر ویروس سروتیپ O با تیتراژ 10^3 TCID₅₀/ml به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مرحله، ۵۰ میکرولیتر از رده سلول IBR-S2 (0.5×10^5) به هر چاهک اضافه شد. نهایتاً، پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، پلیت ها از نظر اثرات سیتوپاتیک (CPE) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمون بر اساس مشاهده CPE تعیین شد. بالاترین رقت سرم، که قادر بود از

Solution اضافه شده و OD نمونه‌ها توسط الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج

تأثیر میدان شعوری فرادرمانی بر تکثیر، تیترو تعداد کپی RNA در ویروس FMD

در این مطالعه، سازگاری ویروس با سلول‌های BHK، رشد و تکثیر آنها در کشت سلولی ارزیابی شد. نتایج تیتراسیون ویروس (TCID₅₀) در جدول ۱ ارائه شده است. به طور متوسط، در هر پاساژ، ۰/۵ لوگ به تیترو ویروس اضافه شد. مدت زمان اثرات سیتوپاتیک مشاهده شده از ۶ تا ۷ ساعت پس از تلقیح ویروس آغاز شد و در ۱۲ ساعت به اوج خود رسید. در کشت‌های تحت تأثیر میدان شعوری فرادرمانی، سلول‌ها توانستند در مقابل ویروس بیشتر زنده بمانند.

نتایج آزمون real-time RT-PCR با مقادیر Ct ارزیابی شد. در مقادیر Ct بین گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار شده با میدان شعوری فرادرمانی تفاوت وجود داشت. مقادیر پایین تر Ct در گروه تیمار با میدان شعوری فرادرمانی نشان داد که تعداد ویروس‌ها در نمونه‌های تحت تیمار با میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود.

آزمایش خنثی سازی سرم (SN): تیتراسیون آنتی بادی‌های خنثی کننده ویروس

در این مطالعه، ارزیابی سرولوژیکی نمونه‌ها در فواصل ۱۴ روزه پس از واکسیناسیون انجام شد (جدول ۱). سرم‌های هر گروه در هر مرحله از نمونه گیری، خون‌ها با هم مخلوط شدند (ادغام شدند). در همه گروه‌ها، تغییر معنی داری در سطح آنتی بادی در مرحله نمونه گیری خون دوم (قبل

CPE در ۵۰٪ چاهک‌ها جلوگیری کند، به عنوان تیترو آنتی بادی خنثی در نظر گرفته شد. در نهایت، تیتروهای سرم محاسبه شد.

الیزا

ویروس FMD سروتیپ O با بافر کوتینگ^۲، (NaHCO_3)، به نسبت ۱/۱۰ رقیق شد، ۱۰۰ میکرولیتر آن به ۹۶ چاهک میکروپلیت اضافه شد و در ۴ درجه سانتیگراد یک شب انکوبه شد. تمام محتویات میکروپلیت تخلیه و سه بار با PBS-T شسته شد (۵۰۰ میکرولیتر PBS، ۲۰ میکرولیتر توئین ۲۰). از شیر بدون چربی ۵٪ در (PBS-T) برای مسدود کردن فضای خالی بین مولکول‌های آنتی ژن در کف چاهک‌ها استفاده شد. پس از بلاکینگ، چهار بار با بافر شستشو انجام شد. برای تعیین رقت مناسب سرم‌ها، دو نمونه سرم کنترل مثبت و منفی بصورت چکر بورد^۳ رقیق شدند. چهار رقت (۱:۲۵، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰) از سرم‌های ذکر شده تهیه و در PBS-T و ۱٪ شیر بدون چربی آزمایش شد. سرانجام، رقت ۱:۱۰۰ به عنوان غلظت مناسب تشخیص داده شد. برای افزودن سرم‌های ناشناخته، ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۷۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. مراحل شستشو چهار بار تکرار شد. برای افزودن آنتی بادی ثانویه، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ثانویه Rabbit Anti-Guinea Pig Horseradish Peroxidase Conjugated (سیگما) به هر چاهک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۵ دقیقه انکوبه گردید. بعد از این مرحله، شستشو ۵ بار انجام شد. سپس، سوبسترای (TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به همه چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت. در پایان ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۱ مولار به عنوان Stop

2. coating buffer
3. checkerboard



Virus	NO.	TCID50 (log)	Overall mean (log)	Distance (log)	C _i values
Faradarmani CF treatment group	1	7.2	6.96	0.53	8
	2	6.7			10
	3	7			8
Control group	4	6.8	6.43		9
	5	6			10
	6	6.5			9
Faradarmani CF treatment group (Second repeat)	1	8.25	8	0.44	6
	2	7.75			7
	3	8			6
Control group (Second repeat)	4	8	7.56		6
	5	7.2			8
	6	7.5			8

میدان شعوری فرادمانی می‌تواند تیمار موثری در افزایش موفقیت ایمن سازی و واکسیناسیون علیه ویروس سروتیپ FMD سروتیپ O باشد. علاوه بر این، میزان سرعت تحریک ایمنی پروتئین VP1 نو ترکیب نسبت به گروه‌های با و بدون تیمار با میدان شعوری فرادمانی در ایمن سازی سوم و چهارم در تیتراسیون آنتی بادی‌های خنثی کننده کمتر بود. اثر میدان شعوری فرادمانی در ایمنی‌زایی واکسن FMD با ادجوانت فروند از ادجوانت آلوم بیشتر بود.

از تزریق دوم) مشاهده شد. افزایش معنی داری در سطح آنتی بادی در تیتراسیون آنتی بادی‌های خنثی کننده در نمونه‌های خون پس از تزریق دوم در همه گروه‌ها به جز گروه کنترل مشاهده شد. جالب توجه است که در گروه‌های تیمار شده با میدان شعوری فرادمانی در واکسن‌های حاوی ادجوانت فروند و ادجوانت آلوم، در رت‌هایی که چندین تزریق دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه‌های کنترل، افزایش قابل توجهی در آنتی بادی‌های محافظ وجود داشت (جدول ۲). بنابراین،

Studied groups	First BS (0 day)	Second BS (14 days)	Third BS (28 days)	Fourth BS (42 days)
FMDV (Type O) + Alum adjuvant	0.3	0.5	0.8	1.4
FMDV (Type O) + Alum adjuvant + FCF	0.3	0.7	1.1	1.7
FMDV (Type O) + Freund adjuvant	0.3	0.5	0.9	1.2
FMDV (Type O) + Freund adjuvant + FCF	0.3	0.8	1	1.9
Alum + recombinant VP1 (Positive Control)	0.3	0.5	0.6	0.8
Negative Control	0.3	0.3	0.3	0.3

BS: خونگیری، FCF: میدان شعوری فرادمانی، VP1: یک پپتید ساختاری ویروسی است که دارای ویژگی‌های ایمنی زایی بالایی است.

ارزیابی غلظت آنتی بادی با کت کردن کل ویروس غیرفعال شده توسط روش الیزا انجام شد و نتایج میانگین OD آن در جدول ۳ نشان داده شده است. سرم‌های هر گروه در هر مرحله از نمونه‌گیری خون با هم ادغام شدند. میزان cut-off ۰/۲ بر اساس نمونه‌های سرمی منفی گاو تعیین شد.

افزایش تیترا آنتی بادی در برابر ویروس FMD سروتیپ O در تمام گروه‌های رت واکسینه شده مشاهده شد. نتایج الیزا نشان دهنده افزایش قابل توجهی در تیترا آنتی بادی در گروه‌های تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با گروه‌های بدون تیمار با فرادرمانی است.

جدول ۳: نتایج آزمایش ELISA پس از تزریق آنتی ژن با مواد ادجوانت آلوم و فروند در گروه‌های مورد مطالعه.

Studied groups	First BS (0 day)	Second BS (14 days)	Third BS (28 days)	Fourth BS (42 days)	Fifth BS (56 days)
FMDV (Type O) + Alum adjuvant	-	0.35	0.59	0.92	2.60
FMDV (Type O) + Alum adjuvant + FCF	-	0.5	0.81	1.2	3.1
FMDV (Type O) + Freund adjuvant	-	0.28	1.10	1.57	2.82
FMDV (Type O) + Freund adjuvant + FCF	-	0.41	1.5	2.1	3.5
Alum+ recombinant VP1 (Positive Control)	-	0.30	0.55	0.42	0.65
Negative Control	-	0.10	0.20	0.15	0.12

BS: خونگیری، FCF: میدان شعوری فرادرمانی، VP1: یک پپتید ساختاری ویروسی است که دارای ویژگی‌های ایمنی زایی بالایی است.

بحث

در کشت ویروس، میدان شعوری فرادرمانی تکثیر ویروس را افزایش داد. ویروس‌ها به عنوان انگل‌های داخل سلول برای تأمین انرژی، سنتز ماکرومولکولی و تکثیر ژنوم به سلول‌های میزبان خود متکی هستند (۱۴، ۱۵). بنابراین در گروه‌هایی که تحت تأثیر میدان شعوری فرادرمانی قرار گرفته بودند، ویروس‌ها زمان بیشتری برای تکثیر در داخل سلول‌های میزبان داشتند.

در مطالعه حاضر، میدان شعوری فرادرمانی باعث افزایش آنتی بادی‌های محافظتی در موش‌هایی شد که چندین تزریق در هر دو گروه واکسن ادجوانت فروند و آلوم در مقایسه با گروه‌های بدون تیمار با میدان شعوری فرادرمانی دریافت کردند. بنابراین، میدان شعوری فرادرمانی می‌تواند برای افزایش موفقیت ایمن‌سازی و واکسیناسیون علیه ویروس FMD

سروتیپ O مورد استفاده قرار گیرد. اثر میدان شعوری فرادرمانی بر ایمنی زایی واکسن ادجوانت حاوی فروند بیشتر از گروه حاوی ادجوانت آلوم بود. ادجوانت کامل فروند یک ادجوانت روغنی است که حاوی مایکوباکتریوم است، اما ادجوانت آلوم (هیدروکسید آلومینیوم) یک ماده ادجوانت معدنی است. با توجه به این یافته‌ها، به نظر می‌رسد که اثر میدان شعوری فرادرمانی احتمالاً در ادجوانت‌های پایه آلی یا آنهایی که دارای اجزای آلی هستند بیشتر است. علاوه بر این، نتایج الیزا نشان دهنده افزایش قابل توجهی در تیترا آنتی بادی در گروه‌های تحت تأثیر میدان شعوری فرادرمانی در مقایسه با گروه‌های کنترل بود. به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال رت‌ها در برابر آنتی ژن‌های غیرفعال هدف در گروه‌های کنترل، حداقل باید دو تزریق انجام شود. با این حال، در گروه‌های تحت اثر میدان شعوری فرادرمانی، این اثر محافظتی



در تزریق دوم کامل شد. قدرت ایمنی زایی آنتی ژن کامل ویروس FMD سروتیپ O کشته شده با مواد ادجوانت فروند و آلوم بسیار بیشتر از پروتئین VP۱ بود. مشابه نتایج آزمایش الیزا، در تست خنثی سازی سرم بر روی آنتی ژن با ترکیب ادجوانت فروند کامل و ناقص، سطح بالاتری از آنتی بادی‌ها در سرم‌های گروه میدان شعوری فرادرمانی نسبت به گروه کنترل و آلوم ارزیابی شد. به نظر می‌رسد استفاده از میدان شعوری فرادرمانی به عنوان یک عامل مکمل در ایمن سازی و واکسیناسیون می‌تواند باعث ایجاد پاسخ ایمنی بیشتر و ایمنی بهتر در دام شود.

در تحقیقات پیشین، ما شاهد تأثیرات میدان‌های شعوری (ط) بر سلول سرطانی MCF7 (۱۶)، تأثیر بر بیماری آلزایمر مدل موش صحرایی (۱۷)، حافظه فضایی و رفتار اجتنابی یک مدل موش صحرایی دارای بیماری آلزایمر (۱۸)، گیاه گندم تحت تنش شوری (۱۹)، رشد جمعیت باکتریایی (۲۰)، رشد ویروسی (۲۱) و فعالیت الکتریکی مغز در طول مدت انجام فرادرمانی

در میان جمعیت فرادرمانگراها (۲۲) بودیم. همانطور که ذکر شد، از آنجایی که میدان‌های شعوری (ط) نه ماده هستند و نه انرژی، مستقیماً قابل اندازه‌گیری نیستند اما بررسی تأثیرات آنها به طور غیر مستقیم از طریق آزمایش‌های مختلف امکان پذیر است. ما پیشنهاد می‌کنیم محققین دیگر تحقیقات بیشتری برای روشن شدن اثر میدان‌های شعوری (ط) بر واکسن‌های مختلف انجام دهند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی کیوان (KVSL) در تهران انجام شده است، ما از اعضای این آزمایشگاه برای کمک در آزمایشات تشکر می‌کنیم.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی را اعلام نکردند.

منابع

1. Grubman M. J. & Baxt B. (2004). Foot-and-mouth disease. *Clinical microbiology reviews*, 17, 465-493.
2. Arzt J., Baxt B., Grubman M., Jackson T., Juleff N., Rhyan J., Rieder E., Waters R. & Rodriguez L. (2011). The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus-Host Interactions. *Transboundary and emerging diseases*, 58, 305-326.
3. Robinson L., Knight-Jones T. J., Charleston B., Rodriguez L., Gay C., Sumption K. J. & Vosloo W. (2016). Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 5-biotherapeutics and disinfectants. *Transboundary and emerging diseases*, 63, 49-55.
4. Klein J. (2009) Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease virus. *Infection, genetics and evolution*, 9, 153-161.
5. Yang M., Holland H. & Clavijo A. (2008). Production of monoclonal antibodies against whole virus particles of foot-and-mouth disease virus serotype O and A and their potential use in quantification of intact virus for vaccine manufacture. *Vaccine*, 26, 3377-3382.
6. Knowles N. & Samuel A. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus research*, 91, 65-80.
7. Lyons N. A., Knight-Jones T. J., Bartels C., Paton D. J., Ferrari G., Vermillion M. S., Brooks A. W., Motroni R., Parker E. & Berquist M. L. H. (2019). Considerations for design and implementation of vaccine field trials for novel foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 37, 1007-1015.
8. de Los Santos T., Diaz-San Segundo F. & Rodriguez L. L. (2018). The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease. *Current opinion in virology*, 29, 16-25.
9. Mahapatra M. & Parida S. (2018). Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. *Expert review of vaccines*, 17, 577-591.
10. Lee M. J., Jo H., Park S. H., Ko M.-K., Kim S.-M., Kim B. & Park J.-H. (2020). Advanced Foot-And-Mouth Disease Vaccine Platform for Stimulation of Simultaneous Cellular and Humoral Immune Responses. *Vaccines*, 8, 254.

11. Taheri M. A. (2013). *Human from another outlook* (2nd Edition). ISBN-13: 978-1939507006, ISBN-10: 1939507006.
12. Reed L. J. & Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 27, 493-497.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
14. Whitaker-Dowling P. & Youngner J. S. (1999). VIRUS-HOST CELL INTERACTIONS. *Encyclopedia of Virology*, 1957.
15. de Castro I. F., Volonté L. & Risco C. (2013). Virus factories: biogenesis and structural design. *Cellular microbiology*, 15, 24-34.
16. Taheri M. A., Semsarha F., Mahdavi M., Afsartala Z. & Amani L. (2020a). 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*.
17. Taheri M. A., Torabi S., Nabavi N. & Semsarha F. (2021b). Faradarmani Consciousness Field Suppresses Alzheimer's Disease Development in Both in Vitro and in Vivo Models of The Disease.
18. Taheri M. A., Torabi S., Nabavi N. & Semsarha F. (2021c). Influence of Faradarmani Consciousness Field (FCF) on Spatial Memory and Passive Avoidance Behavior of Scopolamine Model of Alzheimer Disease in Male Wistar Rats.
19. Torabi S., Taheri M. A. & Semsarha F. (2020). Alleviative effects of Faradarmani Consciousness Field on Triticum aestivum L. under salinity stress. *F1000Research*, 9, 1089.
20. Taheri M. A., Zarrini G., Torabi S., Nabavi N. & Semsarha F. (2021d). Influence of Fara-darmani Consciousness Field on Bacterial Population Growth. *BioRxiv*.
21. Taheri M. A., Etemadi M. R., Torabi S., Nabavi N. & Semsarha F. (2021a). Evaluation of the Influence of Faradarmani Consciousness Field on Viral Growth.
22. Taheri M. A., Semsarha F. & Modarresi-Asem F. (2020b). An Investigation on the Electrical Activity of the Brain during Fara-Darmani Connection in the Fara-Therapist Population.