

سرکوب پیشروی بیماری آلزایمر در مدل‌های *in vivo* و *in vitro* با استفاده از میدان شعوری فرادرمانی

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

۱. بخش تحقیق و توسعه - Science-
fact، مرکز تحقیقات Cosmintel
Inc.، انتاریو، کانادا

۲. دپارتمان 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

چکیده

بیماری آلزایمر (AD) یکی از دلایل معمول فراموشی است که بار روانی و مالی زیادی بر ملت‌های سراسر جهان وارد کرده است. بنابراین، نیاز به استراتژی‌های درمانی یا داروهایی برای این بیماری کاملاً احساس می‌شود. هدف این مطالعه بررسی اثرات یک روش جدید غیر دارویی در درمان بیماری آلزایمر، بر اساس میدان‌های شعوری معرفی شده توسط محمدعلی طاهری است. این رویکرد در سطح فرایندهای سلولی و مولکولی عمل می‌کند. در این مطالعه، اثر میدان شعوری فرادرمانی بر مدل موش بیماری آلزایمر (*in vivo*) و سلول عصبی انسانی (*in vitro*) بررسی شد. در این مطالعه از کشت سلول عصبی انسانی و مدل موش ترومای مغزی (TBI) استفاده کردیم و تغییرات آمیلوپاتی، محتوای پروتئین تائو، تجمع میکروتوبول، زنده ماندن سلول عصبی و نهایتاً رفتار موش TBI در باز بعلاوه‌ای مرتفع را تحت تاثیر فرادرمانی بررسی کردیم. بر اساس نتایج بدست آمده، تیمار سلول عصبی انسانی و مدل موش بیماری آلزایمر با فرادرمانی، منجر به زنده ماندن تقریباً کامل سلول‌های عصبی و حذف آمیلوئیدوپاتی و پروتئین تائو و بهبود رفتاری قابل توجه در موش TBI در باز بعلاوه‌ای مرتفع شد. بر اساس نتایج بدست آمده، تیمار میدان شعوری فرادرمانی پیشروی آلزایمر را در مدل‌های آزمایشگاهی سرکوب کرد. بنابراین، مطالعه بالینی انسانی با هدف معرفی یک طب مکمل جدید برای درمان AD پیشنهاد می‌گردد.

*نویسنده مسئول:

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

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

مقدمه

فراموشی مرتبط به بیماری آلزایمر یک چالش مهم سلامت جهانی در کشورهای صنعتی و غیر صنعتی است (۱). بر اساس سازمان بهداشت جهانی، بیماری آلزایمر و فرمهای دیگر فراموشی هفتمین دلیل مرگ و میر در سال ۲۰۱۹ بوده است و بطور جهانی ۶۵ درصد از آمار فوت را زنان تشکیل می‌دهند. بیماریهای مختلفی منجر به فراموشی می‌شود اما آلزایمر معمول ترین نوع فراموشی در مسن‌ها است و تخمین زده می‌شود که ۶۰ تا ۷۰ درصد موارد را شامل شود (۳). از سال‌ها قبل از شروع علائم، بیماری آغاز می‌شود؛ بنابراین، مطالعات پیش بالینی AD می‌تواند برای مداخلات درمانی فرصتی فراهم کند (۴). تخریب حافظه نزدیک شروع علامت AD است که گاهی همراه با نقص شناختی مانند تغییر در توجه و توانایی حل مسئله است. با پیشروی فراموشی، دیگر نقص‌های شناختی، مانند اختلال عملکرد زبان، مشکلات دید فضایی، از دست دادن بینش نیز به طور مکرر پدیدار می‌گردد (۵). در افراد، این اختلالات شناختی اغلب با تغییرات شخصیت، رفتار، نوسانات خلقی مانند تحریک پذیری، اختلال انگیزه، ابتکار، بی تفاوتی، انزوای اجتماعی و غیره (۶). به منظور مدیریت علائم رفتاری، مداخلات روانشناختی، درمان‌های جایگزین و همچنین درمان‌های ضد افسردگی به کار گرفته می‌شود (۷). از نظر آسیب شناسی، AD با تجمع پیشرونده پلاک‌های بتا آمیلوئید (A β) و کلاف‌های رشته‌ای داخل نورونی متشکل از پروتئین تائو هایپرفسفریله شده تعریف می‌شود (۸، ۹، ۱۰). تجمع A β در مغز عامل اولیه ایجاد بیماری آلزایمر است (۱۱). بنابراین، پاکسازی پپتیدهای آمیلوئید بتا هدف بالقوه‌ای برای تولید داروی آلزایمر است (۱۲). آنزیم‌های مختلفی قادرند A β را تجزیه کنند مانند نپریلیزین و آنزیم‌های تجزیه کننده انسولین. متقابلاً، کاهش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده بتا آمیلوئید می‌تواند به خودی خود منجر به

آلزایمر شود (۱۳، ۱۴). سیستمین پروتئاز کاتپسین بی (Cat B) سطوح پپتیدهای بتا آمیلوئید را خصوصاً A β ۱-۴۲ را از طریق شکست پروتئولیتیک کاهش می‌دهد (۱۵). بعلاوه، گزارش شده است که سیستم پریفرال پتانسیل پاکسازی بتا آمیلوئید مغز و جلوگیری از آلزایمر را دارد (۱۶). همانطور که قبلاً ذکر شد، تجمع تائو در پلاک‌های پیری یکی دیگر از ویژگی‌های آلزایمر است. در وضعیت سلامتی، پروتئین‌های تائو بطور فراوانی همراه میکروتوبول‌ها بوده و نقش حفظ و ثبات میکروتوبول‌ها را در آکسون‌ها بعهده دارند (۱۷). میکروتوبول‌ها ساختار معمول آکسون‌های در حال رشد و توسعه سلول‌های عصبی را پشتیبانی می‌کنند (۱۸، ۱۹). اما، تائو هایپرفسفریله می‌تواند منجر به جدا شدن تائو از میکروتوبول شده و منجر به تشکیل کلاف‌های رشته‌ای داخل نورونی (NFTs) شود (۲۰، ۲۱).

ریسک فراموشی در افرادی که سابقه جراحی و تروما مغز (TBI) را دارند بالاتر است (۲۲). در مطالعه‌ای مشخص شده است که سابقه TBI با شروع زودتر زوال شناختی مرتبط با آلزایمر همراه است (۲۳، ۲۴). گزارش شده است که قبل از تائوپاتی، cis p-tau در انسان‌های TBI در اثر ورزش و نبرد و همچنین در موش و نرون‌های تحت استرس افزایش پیدا می‌کند. در این مطالعه، درمان موش‌های TBI با سیس آنتی بادی از پیشروی تائوپاتی جلوگیری کرد. بنابراین، سیس p-tau می‌تواند یک نشانگر اولیه برای تشخیص و درمان باشد. بعلاوه، ایزوفرم سیس pT231-tau به‌عنوان یک واسطه مرکزی در TBI و تخریب نورونی معرفی شده است. لذا، هدف قرار دادن سیس pT231-tau می‌تواند کاندید خوبی برای ایمونوتراپی در بی نظمی‌های تائو پاتی از جمله AD باشد (۲۵).

از دست رفتن عملکرد کولینرژیک در سیستم عصبی مرکزی در فراموشی و کاهش عملکرد شناختی نقش

دارد (۲۶)، که هدف داروهای ضد آلزایمر بوده است (۲۷). درمان‌های دارویی بطور موقت علائم را بهبود می‌دهند اما نمی‌توانند تخریب نورون را کند یا متوقف کنند (۲۸).

در قرن حاضر، ماهیت Consciousness (آگاهی و هوشیاری) 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^۲ 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 فرادمانگر (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 اندازه‌گیری توسط علم نیستند، اما می‌توان اثرات آنها را بر موضوعات مختلف از طریق آزمایش‌های تکرار پذیر بررسی کرد (۲۹).

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، اثرات میدان شعوری فرادرمانی را بر حافظه فضایی و رفتار اجتنابی مدل رت بیماری آلزایمر را بررسی کردیم (۳۰). نتایج نشان داد که میدان شعوری فرادرمانی حافظه و یادگیری تخریب شده توسط اسکوپولامین را در رت‌ها بهبود بخشید. بعلاوه، اثرات قابل توجه بهبود دهنده-ارتقا دهنده در رفتار غیر فعال اجتنابی آن‌ها مشاهده شد. تغییر در رشد سلول سرطانی (۳۱)، بررسی فعالیت الکتریکی مغز در حین ارتباط فرادرمانی در فرادرمانگران (۳۲) و اثر بهبود دهنده میدان شعوری فرادرمانی بر گیاه گندم تحت تنش شوری (۳۳) مشاهدات دیگری است که از این روش در تحقیق استفاده شده است. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر میدان شعوری فرادرمانی، بر مدل سلولی و حیوانی بیماری آلزایمر است.

مواد و روش‌ها

کاربرد میدان شعوری فرادرمانی

استفاده از میدان شعوری فرادرمانی (و دیگر میدان‌های شعوری (ط)) از طریق ثبت نام در وب سایت تحقیقاتی کازمواینتل (www.cosmointel.com) و ثبت درخواست در قسمت بخش اعلام اتصال، امکان پذیر می‌باشد. برای این منظور، هر محقق بر اساس زمان و محل مورد نظر و با معرفی عمومی آزمایش می‌تواند تیمار میدان شعوری (ط) را برای موضوع مورد مطالعه اعمال کند. گروه تحقیق و توسعه مرکز تحقیق ساینس فکت مستلزم آن است که تیمار میدان‌های شعوری (ط) را تحت نظارت آقای طاهری، ۲۴ ساعته و به صورت

رایگان اختصاص دهد.

در این مطالعه، تیمار میدان شعوری فرادرمانی بطور روزانه بر مدل‌های حیوانی و سلولی AD و در تمام مدت آزمایش از زمانی که مدل ایجاد شد تا انتهای سنجش‌های مربوطه اختصاص داده شد. تمام فرایندهای اجرایی و تجزیه و تحلیل اولیه به صورت دو سو کور و توسط کارشناسان نا آشنا با تئوری میدان شعوری فرادرمانی انجام شده است.

آنتی بادی‌ها: آنتی بادی‌های اولیه شامل cis pT231-tau mAbs (اهدا شده از طرف KPL Harvard)، β -actin mAb (Sigma, St Louis, MO)، Caspase-3 (Abcam, Cambridge, MA)، Tau5 (Biosource Camarillo, CA) و tau T22 اولیگومریک (EMD Millipore)، آنتی بادی‌های پلی کلونال (Billerica, MA) بودند.

تولید سلول‌های پروژنیاتور عصبی جنینی انسان (hESC-NPCs)

سلول‌های بنیادی پلوری پوتنت القا شده (iPSCs) از دو بیمار آلزایمری دیررس و دو نمونه سالم مطابق با سن از بانک سلول رویان (Royan Cell Bank) گرفته شد که به نوبه خود از فیبروبلاست‌های به کار گرفته شده از فاکتورهای Yamanaka تولید شده بودند. iPSCs سپس به NPCs تمایز یافتند. محیط کشت القای نورون متشکل از محیط کشت DMEM/F12 بود (Gibco, 21331020) که سرم knockout پنج درصد به آن اضافه شده بود (Gibco, 10828028)، گلوتامکس (MEM-) (Gibco, 25030081)، NEAA (Gibco, 11140050)، 1 (Gibco, 17502048)، 5 μ M SB431242 (Cyman, 13031)، 3 μ M Dorsomorphin (Stemgent, 04-0024)، 0.5 μ M (Stemgent, 04-0004-CHIR99021) و 0.5 μ M (Cayman, 912545) SAG-86-9. ساختارهای فرم روزت بصورت دستی بعد از هفت روز از القا برداشته شدند. NPCs سپس بر دیش‌های کشت بافت شامل 1mg/

mL لامینین و 15mg/mL پلی-1-اورنیتین (Sigma-) Aldrich)، در محیط کشت توسعه سلول عصبی شامل DMEM-F12 تکمیل شده با سرم 5% knockout (serum replacement (KOSR)، ۱ درصد آمینو اسید غیر ضروری، ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۲ درصد (همه تهیه شده از Invitrogen)، ۰/۱ میلی مولار بتا-مراکاپتواتانول، ۲۰ ng/ml فاکتور رشد بیسیک فیبروبلاست (bFGF، انستیتو رویان)، ۲۰ng/ml فاکتور رشد اضافی اپیدرمال (EGF، Sigma-Aldrich) و ۰/۲ میلی مولار اسید آسکوربیک (Sigma-Aldrich) ری پلیت شدند. محیط کشت به مدت هفت روز، یک روز در میان عوض شد. بعد از تمایز نوروها، محیط کشت توسعه با محیط تمایز یافته به وسیله حذف فاکتورهای رشد (bFGF) و اضافه کردن hGDNF (pr-1107)، hBDNF (PR-1113) و cAMP (Sigma, D0627) به مدت 35 روز جایگزین شد. فرایند تمایزیابی پیگیری و با SOX2, PAX6, NESTIN, NCAM, GFAP, MAP2, GAD65, GABA و رنگ آمیزی S100 تایید شد.

استرس محرومیت تغذیه ای

بطور نرمال محیط کشت بر طبق پروتکل تمایزیابی هر چهار روز عوض می شود. اما به منظور ایجاد استرس گرسنگی یا استرس تغذیه به سلول ها به مدت ۹۶ ساعت دیگر محیط کشت را عوض نکردیم. بطور ابتدایی فرایند تاو پاتی در محیط کشت سلول دیده شد و بعد از ۹۶ ساعت محرومیت تغذیه ای تاو پاتی پایدار مشاهده شد، با یافته های قبلی در تطابق می باشد (۲۴).

سنجش سلول زنده و مرده

رنگ آمیزی دابل فلورسین دی استات (FDA) و پروپیدیوم دیدید (PI) برای سنجش زنده ماننی استفاده شد. مقادیر ۲۰ میکرولیتر FDA محلول استوک و ۵۰ میکرولیتر PI محلول استوک در ۱۰ میلی لیتر PBS رقیق شدند (۳۴). سلول ها بطور ابتدایی با PBS سرد

شسته شدند و سپس محلول FDA/PI به سلول ها اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای اتاق با محلول، توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. رنگ آمیزی سلول. سلول ها در زمان های مختلف برداشت شدند و با پارافرمالدهید (PFA) ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی تثبیت شدند. آنها یا مستقیماً توسط میکروسکوپ مشاهده شدند یا با آنتی بادی ها رنگ آمیزی شدند. در پردازش بیشتر، آنها در معرض نفوذ ۰/۲ درصد تریتون X1۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و با آنتی بادی های اولیه در طی مدت یک شب و در ۴ درجه سانتی گراد رنگ آمیزی شدند. سپس با الکسا فلور ۴۸۸ یا ۵۶۸ آنتی بادی های ثانویه کنژوگه شده به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. نمونه ها با میکروسکوپ کنفوکال Zeiss (LSM ۸۰۰) دیده شدند.

جراحی تروما مغزی

مدل موش TBI همانطور که قبلاً گفته شده استفاده شد (۲۴). بطور عمده، ۱۸ موش نر C57BL/6 (۲-۳ ماه سن)، از خدمات حیوان Royan گرفته شد، بطور تصادفی در معرض جراحی یا جراحی-شم قرار گرفتند. موش ها به مدت ۴۵ ثانیه با استفاده از ۴ درصد ایزوفلوران در یک مخلوط ۷۰:۳۰ هوا: اکسیژن بیهوش شدند. موش های بیهوش شده بر یک وایپر تسک ظریف قرار داده شدند (Kimwipe, Kimberly-Clark, Irving, TX) و طوری قرار گرفتند که سر مستقیماً زیر یک لوله راهنمای توخالی قرار گرفت و دم موش گرفته شده بود. از یک پیچ فلزی ۴۵ گرمی برای ضربه زدن به قسمت پشتی جمجمه استفاده شد که منجر به چرخش سریع شد. با این کار موش ها تحت جراحی شدید منفرد قرار گرفتند (ssTBI، ۶۰ اینچ ارتفاع). موش های جراحی-شم تحت بیهوشی قرار گرفتند اما آسیب مغزی نداشتند. همه موش ها در هوای اتاق ریکاوری

شدند. هر موش برای ۴۵ ثانیه در معرض بیهوشی بود. متعاقباً، آزمایش‌های رفتاری و بافت شناسی بعدی بصورت کور انجام شد.

ایمونوهیستوشیمی

موش‌ها بعد از جراحی در زمان‌های مختلف تحت تزریق پی اف ای چهار درصد (۴٪ PFA) قرار گرفته و مغزها برای آنالیز بیشتر برداشته شد. سریال هشت میکرومتری از بخش‌های کورونال مغزهای شم و آسیب دیده بریک کریواستات (Leica) بریده شد و بریک اسلاید جمع شد.

آنالیز ایمونوبلاتینگ

این آنالیز همانطور که قبلاً گفته شده انجام شد (۲۴). بطور خلاصه، بافت‌های مغز، یا سلول‌های کشت شده در بافر RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP 40, 0.1% SDS, 0.5% NaF (Na-deoxycholate, 50 mM NaF شامل پروتئیناز و مهارکننده‌های فسفاتاز لیز شدند و با بافر نمونه SDS میکس شدند و بعد از جوشاندن روی ژل لود شدند. پروتئین‌ها به وسیله الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید حل شدند و به غشای PVDF منتقل شده و با 5 درصد شیر در TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) به مدت یک ساعت رنگ آمیزی شدند. سپس، غشا با آنتی بادی‌های اولیه در پنج درصد شیر در TBST در طی شب و درمای چهار درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس، غشاها با HRP-کونژوگه آنتی بادی ثانویه در پنج درصد شیر در TBST انکوبه شدند. با استفاده از کمیلومینسانس سیگنال‌ها شناسایی شد (Perkin Elmer, San Jose, CA). غشاها شش مرتبه با TBST بعد از هر مرحله شسته شدند. نتایج ایمونوبلاتینگ با استفاده از Quantity One from BioRad کمی شدند.

آنالیز ایمونواستینینگ

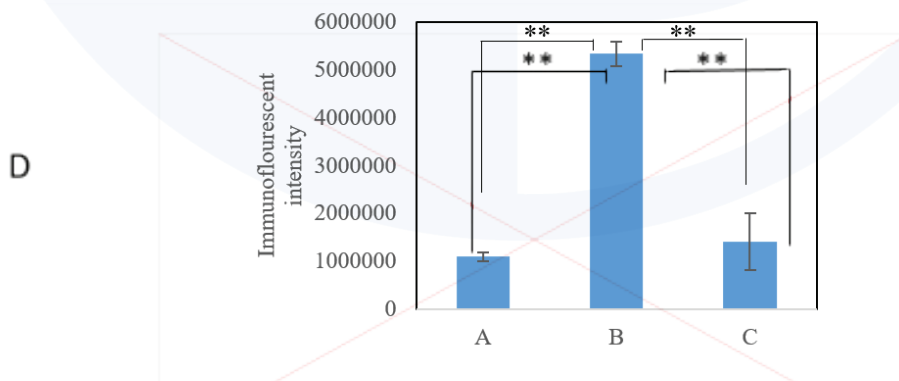
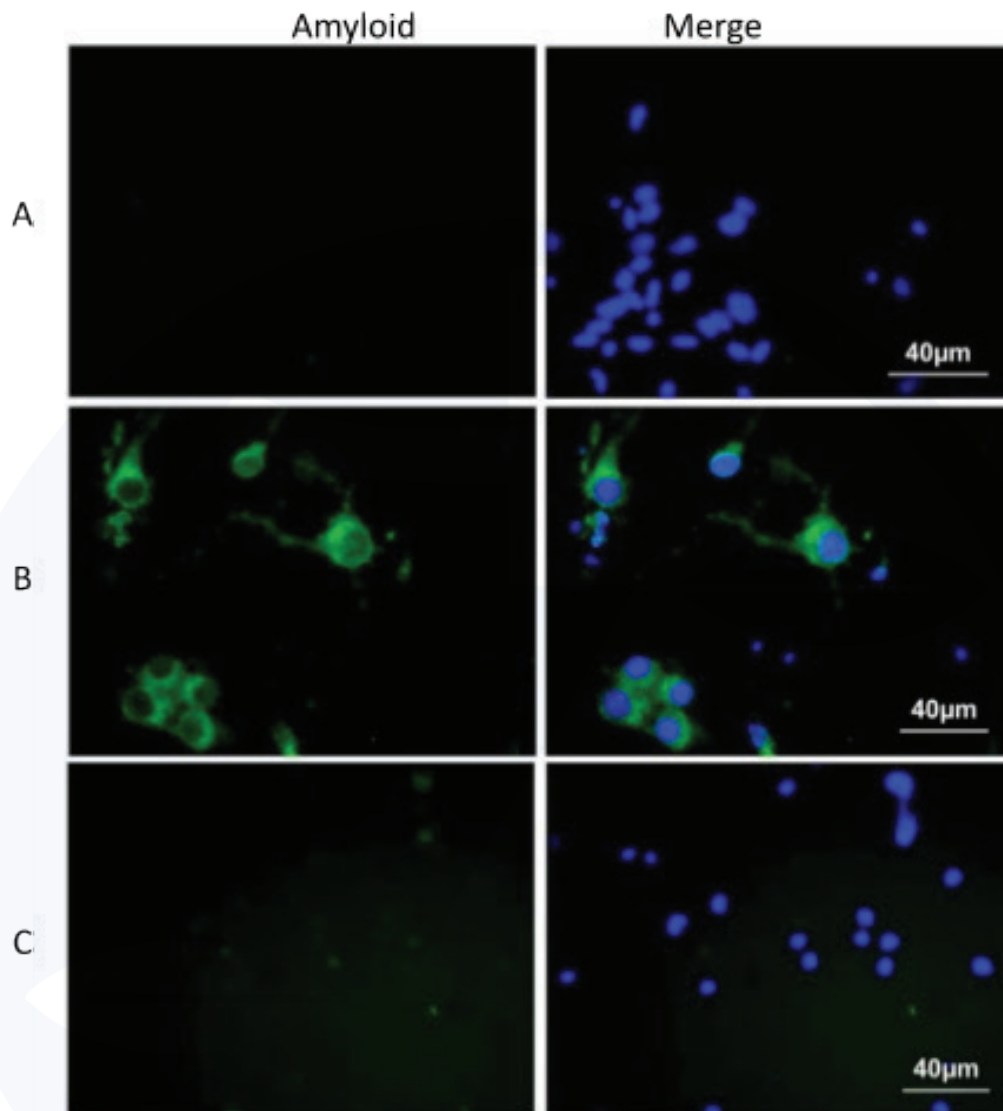
رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت مغز موش‌ها همانطور که قبلاً بیان شده انجام شد (۲۴). بعد از تیمار با پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد، اسلایدها در سدیم سیترات ۱۰ میلی مولار، pH 6.0 برای بازیابی آنتی ژن جوشانده شد. برش‌ها با آنتی بادی‌های اولیه تمام شب در 4 درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس، برش‌ها با آنتی بادی‌های ثانویه کنژوگه Alexa Fluor 488 یا 568 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. برش‌ها سه مرتبه با TBS بعد از هر مرحله شسته شد. آنها با میکروسکوپ کونفوکال (Zeiss LSM 800) دیده شد. لیزر کونفوکال در سطحی ست شد که سیگنال‌های فلورسنت شامل اتوفلورسنس در برش‌هایی بدون آنتی بادی اولیه اما دارای آنتی بادی ثانویه دریافت نشود.

ماز بعلاوه‌ای مرتفع

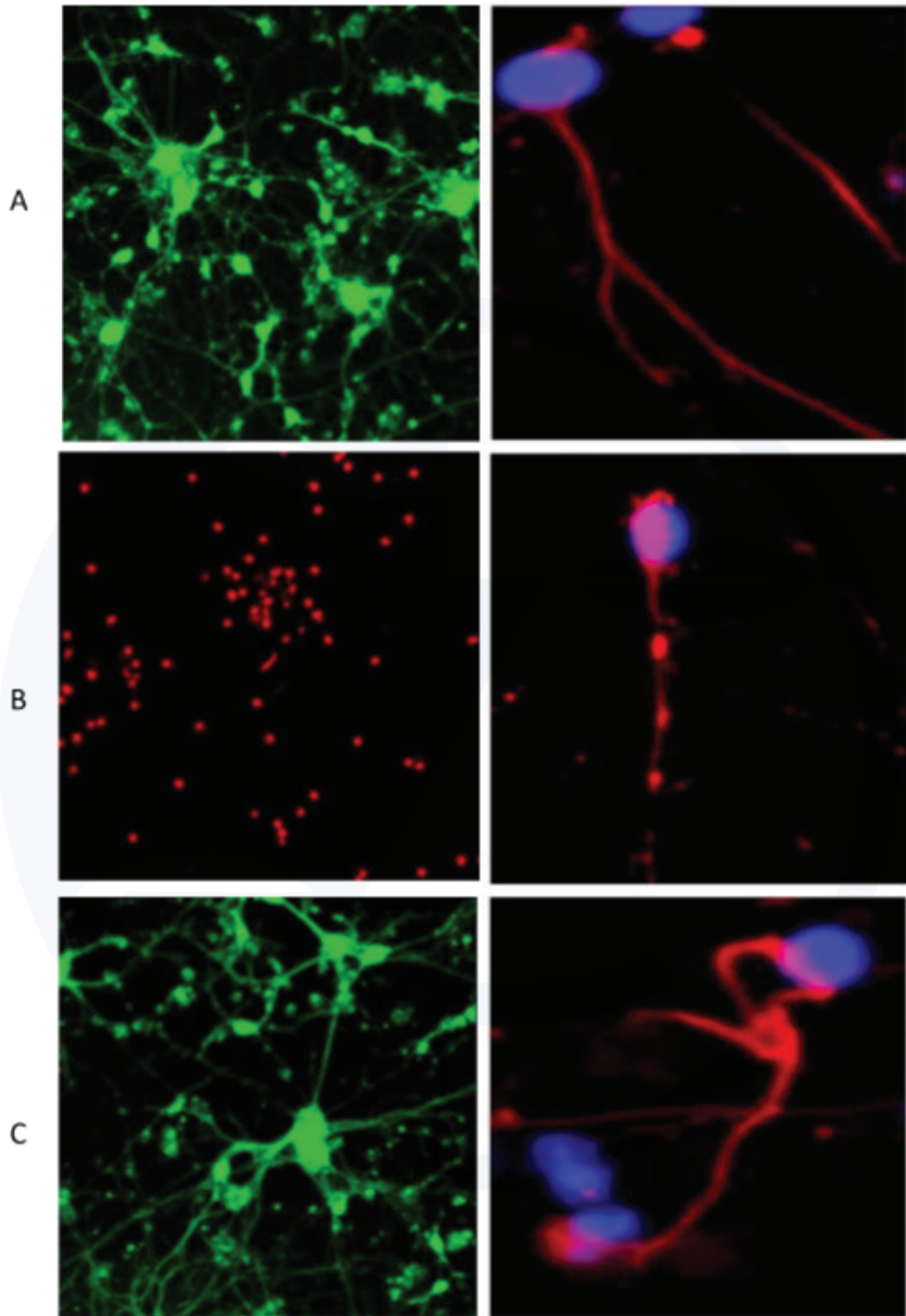
ماز بعلاوه‌ای مرتفع برای سنجش اضطراب دو ماه بعد از جراحی استفاده شد و همانطور که توضیح داده شده است انجام شد. بطور خلاصه، ماز شامل دو بازوی باز و بسته (30×50 cm) که مخالف هم در یک سکوی مرکزی (منطقه تصمیم گیری) قرار گرفته‌اند. کل دستگاه ۱۰۰ سانتی متر بالاتر از سطح زمین قرار گرفته است. موش‌ها در مرکز سکوی ماز، روبروی بازوی بسته قرار گرفتند و به آنها اجازه داده شد تا دستگاه را به مدت پنج دقیقه کاوش کنند. ماز کاملاً با محلول ضعیف اتانول در بین موضوعات مورد مطالعه ضد عفونی شد. ما کل زمان سپری شده در مرکز باز (منطقه تصمیم گیری) و دو بازوی بسته و دو بازوی باز را ردگیری و ثبت کردیم. درصد زمان سپری شده در بازوهای باز به‌عنوان یک معیار از رفتار ریسک پذیر در نظر گرفته می‌شود.

آنالیز آماری

آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شد. ما هیچ نمونه یا حیوانی را از آنالیز حذف نکردیم. برای همه تست‌های



شکل ۲: نورون‌های رنگ آمیزی شده با آنتی بادی آنتی آمیلوئید در (A) کنترل، (B) محرومیت تغذیه‌ای و (C) نمونه تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی. (D) ارائه کمیتی A, B, C (**).
 (**): $p\text{-value} < 0.001$, اختلاف بین A و C معنادار نبود.



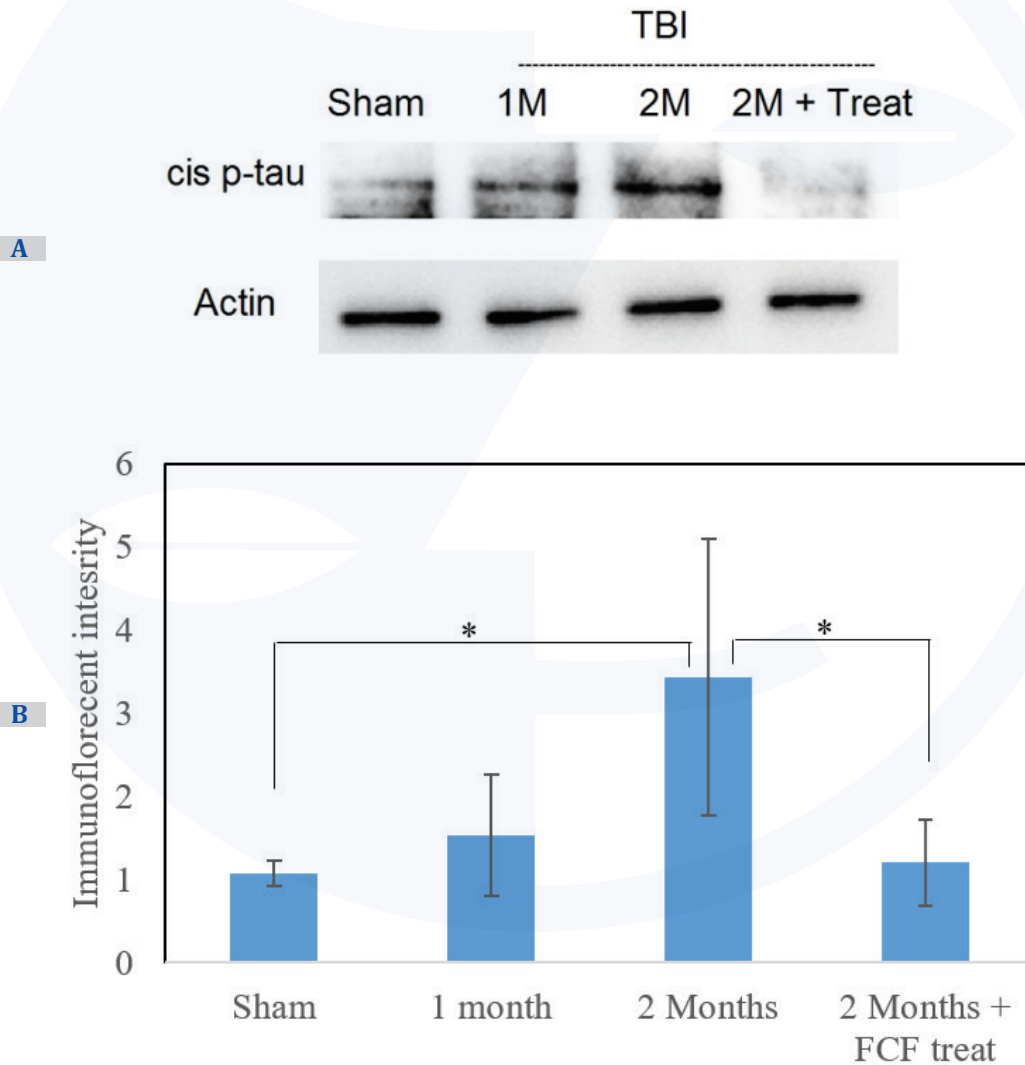
شکل ۳: سنجش سلول زنده و مرده و آزمایش ایمونوبلاتینگ (چپ) و رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس میکروتوبولها (راست) نورو نهای تحت استرس در محیط کشت. (A) کنترل، (B) شم و (C) نمونه های تحت تیمار میدان شعوری فرادرمانی.

ایمونوفلورسنت سلول‌ها تایید شد.

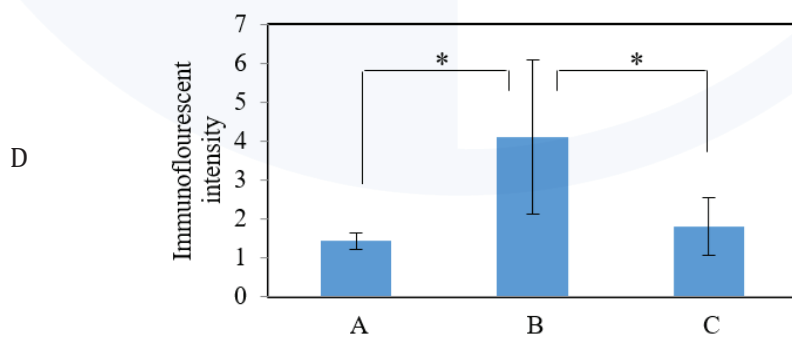
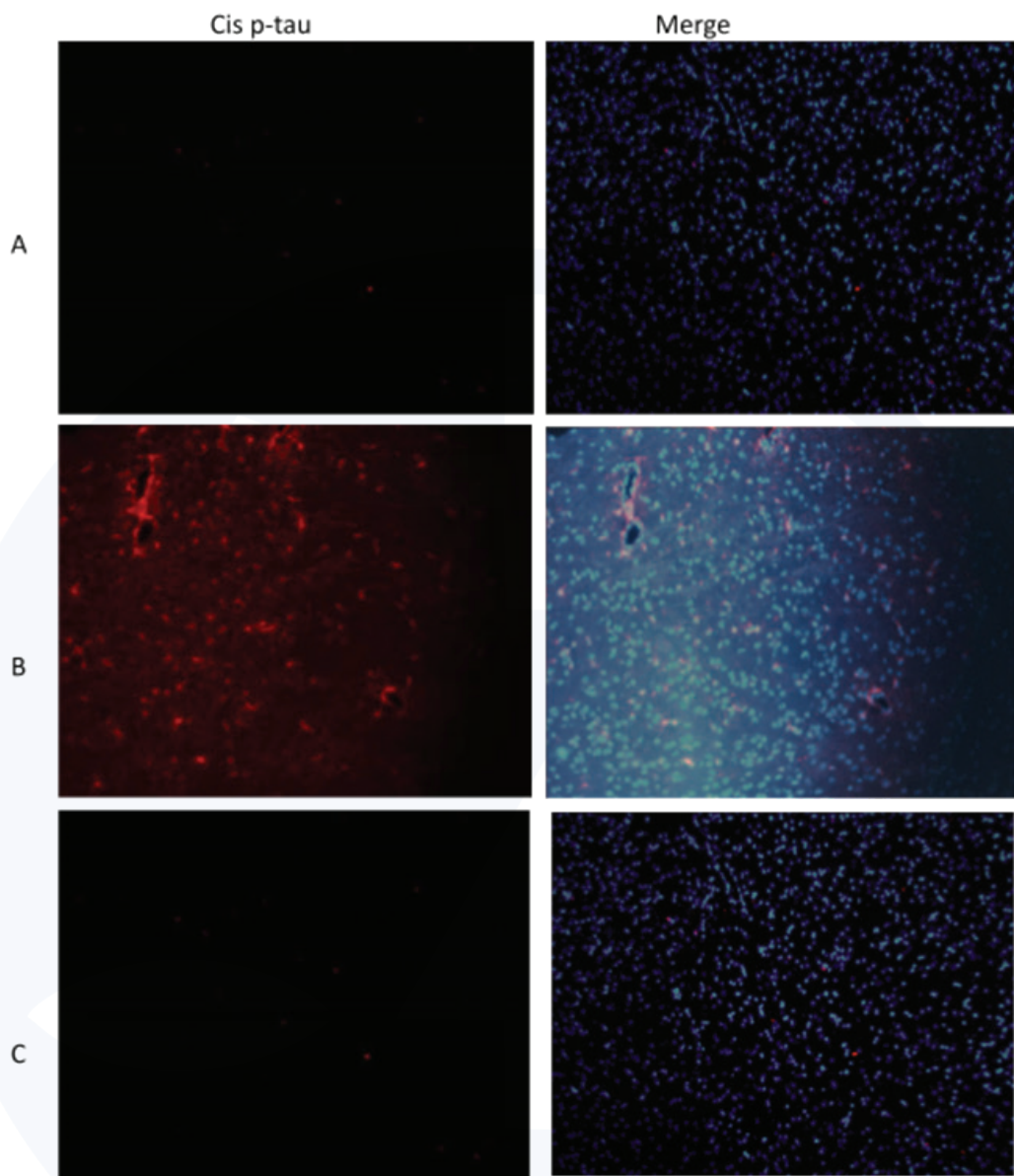
بررسی‌های *in vivo*

در بررسی *in vivo* مدل موش AD، تولید پروتئین p-tau (تائوپاتی) در نمونه‌های مختلف ارزیابی شد و در شکل ۴ و ۵ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل‌ها مشاهده می‌شود، در حالیکه جراحی تروما مغزی باعث القای نوروتوکسیک p-tau در مغز شد،

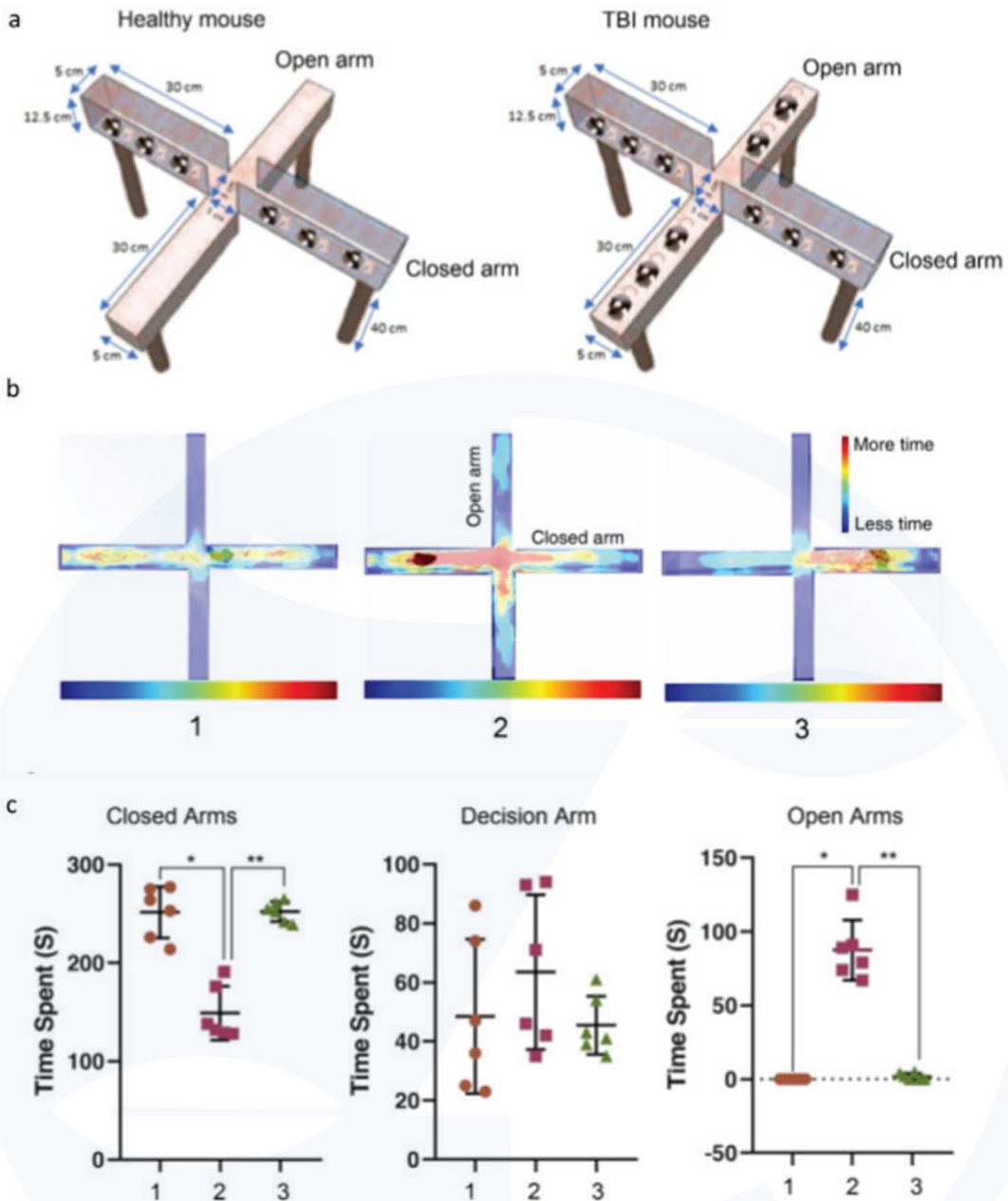
تیمار میدان شعوری فرادمانی تجمع p-tau را سرکوب کرد. بعلاوه، با استفاده از ماز بعلاوه‌ای مرتفع، کاهش شناختی در مدل موش TBI بررسی شد. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، بهبود کامل رفتاری در موش‌های تحت تیمار FCF بطوری است که در مقایسه با گروه کنترل رفتاری مبتنی بر عملکرد بهینه مغز را در رابطه با حافظه، خصوصاً در بازوی تصمیم،



شکل ۴: ایمونوبلاتینگ (A) و ایمونوفلورسنت (B) آنالیز مغز موش رنگ آمیزی شده با آنتی بادی p-tau در شرایط مختلف. (C) ارائه کمی A و B (*: p-value < 0.01).



شکل ۵: مغز موش TBI رنگ آمیزی شده با ایمونوفلورسنت با آنتی بادی (A) p-tau) شم، (C) TBI، (B) تیمار میدان شعوری فرادرمانی موش (D) TBI. ارائه کمی (A, B, C *: p-value<0.01).



شکل ۶: آنالیز رفتاری مدل‌های موش TBI با ماز بعلاوه‌ای مرتفع. (A) ارائه شماتیک موش TBI و سالم. (b) نقشه مسیر موش در بازوهای مختلف ماز بعلاوه‌ای. (c) کمیت رفتار موش بر اساس زمان سپری شده در مناطق مختلف ماز بعلاوه‌ای. (۱) موش سالن (کنترل)، (۲) موش ۲ ماه بعد از آغاز TBI (۳) موش دو ماه بعد از TBI با تیمار میدان شعوری فرادرمانی (*: p-value<0.001, **: p-value<0.05).

نشانی می‌دهند. سلول‌های عصبی AD تحت استرس، زنده‌مانی آن‌ها، پایداری میکروتوبول‌ها و کاهش در آمیلوئیدوپاتی تفاوت واضحی در مقایسه با گروه شم و بدون تیمار دارد. بیماری آلزایمر به‌عنوان یکی از گران‌ترین بیماری‌ها در سنین بالا محسوب می‌شود و لذا توسعه مداخلات درمانی برای کاهش یا جلوگیری از علائم آن بسیار مورد توجه است.

بحث

این مطالعه پیگیری ارزیابی اثر میدان شعوری فرادرمانی بر تغییرات رفتاری مدل موش بیماری آلزایمر بعلاوه بررسی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی درگیر در بیماری آلزایمر می‌باشد. کاهش غلظت پروتئین تائو در

نتیجه گیری نهایی

بطور کلی، در این مطالعه با بررسی اثرات یک روش جدید غیر دارویی در درمان آلزایمر، پیشروی بیماری در مدل آزمایشگاهی سرکوب شد. نتایج نشان می‌دهد که میدان شعوری فرادرمانی یک فاکتور مهم بر سیستم‌های بیولوژیکی، خصوصاً در سطح سیستم عصبی است و می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند در درمان‌ها اختلال‌ها و بیماری‌ها استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دپارتمان مغز و علوم شناختی، پژوهشکده بیولوژی و تکنولوژی سلول‌های بنیادی رویان، برای ارائه خدمات جهت جمع آوری داده‌های این کار پژوهشی تشکر و قدردانی می‌کنند.

تاییدیه اخلاق و رضایت مشارکت

همه آزمایش‌های حیوانی توسط کمیته نهادی مراقبت و استفاده از حیوانات انستیتو رویان (تهران، ایران) تایید شد و منطبق با راهنمای NIH برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود.

تضاد منافع

نویسندگان، بیان می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

درمان دارویی هنوز میسر نیست، بنابراین در این مطالعه ما اثرات درمانی میدان شعوری فرادرمانی بر AD مدل حیوانی و سلولی را آزمایش کردیم. استفاده از میدان شعوری فرادرمانی همانطور که توسط محمدعلی طاهری معرفی شده است در زمینه‌های مختلف در دهه گذشته بررسی شده است. چون میدان‌های شعوری (ط) ماده و انرژی نیستند، نمی‌توانیم با ابزارهای علمی آن‌ها را اندازه گیری کنیم. اما می‌توانیم اثرات آن‌ها را بر موجودات زنده و غیر زنده اندازه گیری کنیم. ما مشاهده کردیم که میدان شعوری فرادرمانی، موضوع تحت مطالعه را در سطوح مولکولی و سلولی علاوه بر کل موجود زنده در یک وضعیت تکرار پذیر تحت تاثیر قرار داد. یک مزیت استفاده از میدان شعوری فرادرمانی رویکرد غیر دارویی و غیر مداخله‌ای آن در دستیابی به نتیجه است. این ویژگی، خصوصاً در بیماری‌هایی که فرم‌های دارویی و دیگر فرم‌های درمانی در تیمار سیستم‌های زنده ندارند، کمک کننده است. چون دسترسی به میدان شعوری فرادرمانی، رایگان و قابل دسترس برای همه محققان می‌باشد، ما استفاده از آن را برای بررسی اثربخشی میدان‌های شعوری (ط) و خصوصیات آن‌ها در سیستم‌های مشابه یا متفاوت را پیشنهاد می‌کنیم. برای مثال، اثر میدان شعوری فرادرمانی در تیمار دیگر اختلال‌های نورولوژیک مانند پارکینسون، مالتیپل اسکلروزیس یا اسکروز جانبی آمیوتروفیک می‌تواند مورد توجه ویژه قرار بگیرد.

منابع

1. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments for Alzheimer's disease. Therapeutic Advances in Neurological Disorders. 2013;19-33. doi:10.1177/1756285612461679
2. World Health Organization (WHO), The top 10 causes of death, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
3. Barker ww, Luis CA, Kashuba A, Luis M, Harwood DG, Loewenstein D, Waters C, Jimison P, Shepherd E, Sevush S, Graff-Radford N, Newland D, Todd M, Miller B, Gold M, Heilman K, Doty L, Goodman I, Robinson B, Pearl G, Dickson D, Duara R. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2002; Oct-Dec;16(4):203-12. doi: 10.1097/00002093-200210000-00001. PMID: 12468894.
4. Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C. R., Jr, Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M. V., ... Phelps, C. H. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association. 2011; 7(3), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>
5. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. Sci Transl Med. 2011; 3(77):77sr1. doi: 10.1126/scitranslmed.3002369. PMID: 21471435; PMCID: PMC3130546
6. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's Dement. 2011;7(3):263-269. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005
7. Ballard, C., Gauthier, S., Cummings, J. et al. Management of agitation and aggression associated with Alzheimer's disease. Nat Rev Neurol.

2009; 5, 245–255. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.39>

8. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2010; Apr 15;19(R1):R12–20. doi: 10.1093/hmg/ddq160. Epub 2010 Apr 22. PMID: 20413653; PMCID: PMC2875049.
9. Trojanowski J. Q., & Lee, V. M. "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2000; 924, 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05561.x>
10. Guénette SY. Mechanisms of Abeta clearance and catabolism. *Neuromolecular Med.* 2003;4(3):147–60. doi:10.1385/NMM:4:3:147. PMID: 14716023.
11. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353–6. doi: 10.1126/science.1072994. Erratum in: *Science.* 2002;297(5590):2209. PMID: 12130773.
12. Wang, Y. J., Zhou, H. D., & Zhou, X. F. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug discovery today.* 2006; 11 (19–20), 931–938. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.08.004>
13. Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008; 18(2):240–52. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00132.x. PMID: 18363935.
14. Eckman EA, Eckman CB. Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans.* 2005; Nov;33 (Pt 5):1101–5. doi: 10.1042/BST20051101. PMID: 16246055.
15. Mueller-Steiner, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L., & Gan, L. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron.* 2006; 51(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.027>
16. Xiang, Y., Bu, X.L., Liu, Y.H. et al. Physiological amyloid-beta clearance in the periphery and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2015; 130, 487–499. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1477-1>
17. Dotti C.G., Banker G.A., Binder L.I. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience.* 1987; Volume 23, Issue 1, Pages 121–130, ISSN 0306-4522, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90276-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90276-4).
18. Slaughter T, Wang J, Black MM. Microtubule transport from the cell body into the axons of growing neurons. 1997; *J Neurosci.* 1997;17(15):5807–5819. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-15-05807.
19. Griffin, W. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006; (Suppl.): 470–474.
20. Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9, 387–398. <https://doi.org/10.1038/nrd2896>
21. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011; 1(1): a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a.006189. PMID: 22229116; PMCID: PMC3234452.
22. Fann JR, Ribe AR, Pedersen HS, Fenger-Grøn M, Christensen J, Benros ME, Vestergaard M. Long-term risk of dementia among people with traumatic brain injury in Denmark: a population-based observational cohort study. *Lancet Psychiatry.* 2018; May;5(5):424–431. doi: 10.1016/S2215-0366(18)30065-8. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29653873.
23. LoBue C, Wadsworth H, Wilmoth K, Clem M, Hart J Jr, Womack KB, Didehban N, Lacritz LH, Rossetti HC, Cullum CM. Traumatic brain injury history is associated with earlier age of onset of Alzheimer disease. *Clin Neuropsychol.* 2017; Jan;31(1):85–98. doi: 10.1080/13854046.2016.1257069. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27855547; PMCID: PMC5224912
24. Kondo, A., Shahpasand, K., Mannix, R., Qiu, J., Moncaster, J., Chen, C. H., Yao, Y., Lin, Y. M., Driver, J. A., Sun, Y., Wei, S., Luo, M. L., Albayram, O., Huang, P., Rotenberg, A., Ryo, A., Goldstein, L. E., Pascual-Leone, A., McKee, A. C., Meehan, W., ... Lu, K. P. Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature.* 2015; 523(7561), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nature14658>
25. Shahpasand K, Sepehri Shamloo A, Nabavi SM, Ping Lu K, Zhen Zhou X. "Tau immunotherapy: Hopes and hindrances". *Hum Vaccin Immunother.* 2018; 14(2):277–284. doi: 10.1080/21645515.2017.1393594. Epub 2017 Dec 1. PMID: 29049003; PMCID: PMC5806642.
26. Lunardi, P., Nardin, P., Guerra, M. C., Abib, R., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. Huperzine A, but not tacrine, stimulates SI00B secretion in astrocyte cultures. *Life sciences.* 2013; 92(12), 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.01.029>
27. Anand, P., Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* 2013. 36, 375–399. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0036-3>
28. Dos Santos Picanco, L. C., Ozela, P. F., de Fatima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., Braga, F. S., de Paula da Silva, C., Dos Santos, C., Rosa, J., & da Silva Hage-Melim, L. I. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current medicinal chemistry.* 2018; 25(26), 3141–3159. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>
29. Taheri MA: "Human from another outlook" Interuniversal Press; 2nd Edition (September 26, 2013). ISBN-13: 978-1939507006, ISBN-10: 1939507006 2013.
30. Taheri, Mohammad Ali and Torabi, Sara and Nabavi, Noushin and Semsarha, Farid, Influence of Faradarmani Consciousness Field (FCF) on Spatial Memory and Passive Avoidance Behavior of Scopolamine Model of Alzheimer Disease in Male Wistar Rats (January 6, 2021). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=>
31. Taheri, MA, Semsarha, F, Mahdavi, M, Afsartala, Z and Amani, Laleh, The Influence of the Faradarmani Consciousness Field on the Survival and Death of MCF-7 Breast Cancer Cells: An Optimization Perspective (October 5, 2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=>
32. Taheri, M.A.; Semsarha, F.; Modarresi-Asem, F. An Investigation on the Electrical Activity of the Brain during Faradarmani Connection in the Fara-Therapist Population. *Preprints.* 2020; 2020090679 (doi: 10.20944/preprints202009.0679.v1).
33. Torabi S, Taheri MA and Semsarha F. Alleviative effects of Faradarmani Consciousness Field on *Triticum aestivum* L. under salinity stress [version 1; peer review: awaiting peer review]. *F1000Research* 2020, 9:1089 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.25247.1>)
34. Jiajia L, Shinghung M, Jiacheng Z, Jialing W, Dilin X, Shengquan H, et al. Assessment of Neuronal Viability Using Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide Double Staining in Cerebellar Granule Neuron Culture. *J Vis Exp.* 2017(123).

