

1. Dipartimento di Scienze Morfologiche e Biomediche – Università di VERONA  
 2. Dipartimento di Scienze Statistiche "Paolo Fortunati" – Università di BOLOGNA  
 salvatore.chirumbolo@univr.it – paolo.bellavite@univr.it – maurizio.brizzi@unibo.it

# Ricerca di base in omeopatia

Gli studi *in vitro* sui neutrofili e basofili umani

## RIASSUNTO

Gli studi *in vitro* rappresentano un ottimo modello per investigare l'azione di differenti rimedi omeopatici e di composti altamente diluiti sulla funzione cellulare e numerosi lavori recenti hanno rivalutato criticamente la ricerca di base in omeopatia. Un modello cellulare promettente è rappresentato dallo studio dei granulociti umani, sia per la loro implicazione nei processi flogistici e immunitari, sia per la loro facilità di utilizzo. La maggior parte delle evidenze riguarda l'azione di rimedi omeopatici a basse o medie potenze sui granulociti neutrofili (*Sulphur 6x*, *Bryonia 4CH* e *9CH*, *Ferrum Phosphoricum 4CH* e *9CH*, *Phosphorus 15x*, etc...), comprendendo diluizioni dinamizzate e commerciali sia di acidi organici, che di sali minerali o derivati vegetali (*Podophyllum compositum*). L'azione di questi rimedi sulla produzione di superossido o sull'adesione *in vitro* ha dato risultati sia di attivazione che di inibizione. Mentre le evidenze sui granulociti neutrofili si riferiscono all'azione di rimedi spesso commerciali a potenze inferiori alla 10CH, il modello del granulocita basofilo è da tempo usato per lo studio di composti diluiti e dinamizzati ad alte potenze (fino alla 16CH o oltre). Numerose evidenze indicherebbero che l'istamina diluita e succussa oltre la 12CH inibisce la funzione cellulare in un modo che spesso è comparabile con le dosi ponderali. Alcuni studi compiuti nel nostro laboratorio, ancora in corso, hanno mostrato un'azione inibitoria dell'istamina diluita e succussa alla 13CH ed alla 14CH in rapporto alla stessa diluizione eseguita con sola acqua. In questo lavoro sono riassunte le principali evidenze in questo settore.

## PAROLE CHIAVE

Neutrofili-Basofili-Ricerca di base in omeopatia-Studi *in vitro*-Composti altamente diluiti

**G**li studi *in vitro* hanno rappresentato un modello per investigare l'azione dei rimedi omeopatici e dei composti altamente diluiti, anche se, in realtà, la ricerca di base della risposta cellulare a soluzioni altamente diluite e dinamizzate sta accumulando nuove evidenze in modo graduale, soprattutto a causa dell'esistenza di lavori contraddittori. Recentemente sono state riportate diverse pubblicazioni inerenti una rivalutazione critica della ricerca di base in omeopatia<sup>1-3</sup>.

Nella ricerca cosiddetta fondamentale sono stati inclusi diversi sistemi modello e sono stati condotte sperimentazioni sia con organismi intatti che con parti isolate, come organi, cellule o frazioni sub-cellulari.<sup>1</sup> I principali

## BASIC RESEARCH IN HOMEOPATHY IN VITRO STUDIES ON HUMAN NEUTROPHILS AND BASOPHILS

### SUMMARY

*In vitro* studies represent a reliable model to investigate the action of several homeopathic medicines or even high diluted/succussed substances on cell function and much evidence concerning a critical reappraisal about basic research in homeopathy has appeared. Human granulocytes are a good promising cellular model due to their involvement in inflammatory and immune response and to their rather easy experimental handling. Most of previously published results are related to the effect of low potency remedies on neutrophil function (*Sulphur 6x*, *Bryonia 4CH* e *9CH*, *Ferrum Phosphoricum 4CH* and *9CH*, *Phosphorus 15x*, and so on), and involved indifferently medicines made up of organic acids, or minerals or plant extracts (*Podophyllum compositum*). Both activation and inhibition on superoxide production and *in vitro* adhesion were observed with these remedies in different experimental conditions. Neutrophil has been used for a long time as a good cellular model to examine commercial remedies as low as 10CH potency, while basophil is still currently used to investigate the effects of very highly diluted and succussed compounds (16CH and over). Many reports have shown that highly diluted (over the Avogadro's limit i.e. upper than the 12<sup>th</sup> centesimal dilution) and succussed histamine, inhibit cellular function, sometimes in a fashion comparable to the ponderal molar dilutions. Some evidences from our laboratory has shown that histamine 13CH and histamine 14CH inhibit basophil function as respect to the same diluted/succussed preparation of water alone. In this report we summarize the main evidence concerning these studies.

### KEYWORDS

Neutrophil-Basophil-Basic research in omeopathy-In vitro studies-High diluted compounds.

vantaggi che vengono attribuiti ai modelli *in vitro* fanno riferimento alla loro intrinseca affidabilità soprattutto quando essi vengono messi a confronto con la valutazione dose-effetto su un intero organismo, un'affidabilità dovuta alla standardizzazione dei protocolli e ad un approccio sperimentale più rapido ed accessibile<sup>3</sup>. In effetti, una definita funzione cellulare indotta e/o regolata da fattori solubili può essere verificata da sistemi automatizzati e da algoritmi metrologici, oltre che da un monitoraggio continuo dentro il processo analitico.

In questa prospettiva, un ruolo strategico è giocato dalla scelta corretta del sistema di saggio. L'uso dei leucociti da sangue periferico umano è stato preferito da diversi autori a causa di tre ragioni: 1) si possono con facilità estrarre da un semplice prelievo di sangue; 2) sono cellule coinvolte nelle difese immuni e nei processi infiammatori; 3) possiedono parametri funzionali che si possono analizzare con protocolli standardizzati *in vitro*.

Quasi tutti i lavori di questo argomento si riferiscono principalmente a studi compiuti sui neutrofili o i basofili, forse per il fatto che i neutrofili sono in maggior numero nel sangue periferico per cui sono facili da purificare e perchè i basofili sono associati ad una elevata sensibilità cellulare, a causa del loro coinvolgimento nelle reazioni di ipersensibilità. In questo articolo cercheremo di fare una rassegna sui principali risultati ottenuti con queste cellule nella ricerca di base in omeopatia.

## NEUTROFILI

La maggior parte degli studi sui possibili ruoli regolatori delle diluizioni omeopatiche nel processo infiammatorio ha riguardato i fagociti ed in particolare i leucociti polimorfonucleati o granulociti neutrofili; in tale contesto, le sostanze analizzate sono state le medesime usate dagli omeopati in situazioni di infiammazione acuta.

Le prime ricerche sui fagociti risalgono agli anni sessanta con le pubblicazioni di Seitchek e di Douch sulle reazioni dei granulociti a rimedi omeopatici presentate al XXV Congresso Omeopatico di Amsterdam e al Congresso Triennale della Liga Omeopatica a Londra nel 1965<sup>4</sup> e da Douch al Congresso Triennale della Liga Omeopatica a Londra nel 1965<sup>5</sup>. Douch aveva studiato tra l'altro anche l'effetto di *Aristolochia clematis*, il cui fito-estratto era stato studiato anche da altri<sup>6-9</sup> e di cui si era indipendentemente evidenziato un'azione altamente tossica e inibitoria sui leucociti. Diversi autori hanno studiato l'effetto del succo di *Ecballium elaterium* sul burst ossidativo dei neutrofili<sup>10</sup> e recenti evidenze hanno riportato che i semi di questa Cucurbitacea contengono un potente inibitore delle serina-proteasi<sup>11</sup>.

Poitevin and coll. riportarono l'effetto di *Belladonna* e di *Ferrum phosphoricum* mostrando che le potenze 5CH e 9CH inibivano la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (misurata in chemiluminescenza, cioè con il rilascio di fotoni generati durante la reazione metabolica) di granulociti stimolati con zymosan opsonizzato<sup>12</sup>. L'inibizione era altamente significativa dato che era comparabile (30-40%) a quella ottenuta con 10 µg/l di dexametasona e da 0,1 mM di indometacina. Gli stessi autori sottolineavano una conside-

*In vitro* studies represented a model to investigate the action of homeopathic remedies and highly diluted substances; actually, basic research of cellular response to highly diluted-dynamized solutions is slowly accumulating new evidence, especially due to the existence of conflicting reports. Critical evaluations of basic homeopathic research have been recently reviewed<sup>1-3</sup>. Main advantages deriving from *in vitro* models are related to their intrinsic reliability due to protocol standardization and to a relatively low time-consuming approach, especially when they are compared to a dose-effect evaluation on the whole organism<sup>3</sup>. Actually, a specific cell function induced and/or regulated by soluble factors can be controlled by automated devices, metrologic algorithms and ongoing checking. In this perspective, a strategic role is played by the proper choice of the assay modeling. The use of human leukocytes was preferred by several authors because of three reasons: 1) they can be easily extracted from a simple blood withdrawal, 2) they are involved in immunity and inflammation; 3) they possess functional parameters that can be analysed by well established *in vitro* protocols. Almost all reports are concerned mainly with neutrophils or basophils, maybe because neutrophils are largely represented in the whole peripheral blood and hence they are easy to extract and because basophils are related to a high cell sensitivity pattern, due to their involvement in hypersensitivity reactions. In this paper we reviewed the results obtained with these cells in homeopathic basic research.

## Neutrophils

Most of the studies of the possible regulatory effects of homeopathic dilutions on inflammation involved phagocytic cells and in particular the polymorphonuclear leukocytes (neutrophil granulocytes): in this context, the tested substances were those used by homeopaths in situations of acute inflammation.

Early research on phagocytes dates back to sixties with reports about oxidase granule reactions to homeopathic remedies by Seitchek in the XXV Homeopathic Congress in Amsterdam<sup>4</sup> and by Douch at the Triennial Congress of the International Homeopathic League, London in 1965<sup>5</sup>. Douch studied the effect of *Aristolochia clematis*, a plant extract which was studied also by others<sup>6-9</sup>, and for which there are evidences about high toxicity and inhibitory function towards leukocytes of this plant extracts. Different authors studied the effect of plant extracts or low potencies of inorganic acids such as the inhibitory effect of *Ecballium elaterium* juice on neutrophil oxidative burst<sup>10</sup> and recent evidence has reported that this *Cucurbitaceae* seeds contain a strong serine-protease inhibitor<sup>11</sup>. Poitevin and coll. reported the effect of *Belladonna* and *Ferrum phosphoricum* by showing that 5CH and 9CH potencies inhibited the production of free oxygen radicals (measured as chemiluminescence, i.e. release of light generated during metabolic reactions) by granulocytes stimulated by opsonized zymosan<sup>12</sup>. The inhibition was highly significant and as much as 30-40%, approximately the same as

revoles differenza nella sensibilità individuale a questi rimedi, un problema precedentemente messo in luce da altri autori che avevano investigato l'effetto di *Belladonna*, *Hepar sulfur*, *Pyrogenium*, *Silicea* e *Staphylococcinum* sulla chemiotassi ottenendo risultati contraddittori<sup>13</sup>.

Tra i vegetali un altro membro della famiglia delle Cucurbitacee è stato studiato sui neutrofili: è stato riportato (comunicazione preliminare) che *Bryonia* 4CH e 9CH hanno mostrato un effetto stimolatorio sul metabolismo ossidativo dei leucociti polimorfonucleati, sia diretto che indiretto (aumentando la risposta a peptidi chemiotattici)<sup>14</sup>.

Il nostro gruppo ha studiato gli effetti di rimedi omeopatici su queste cellule dell'infiammazione ed ha ottenuto significativi risultati particolarmente in relazione alle basse potenze. In un primo momento abbiamo esplorato il possibile effetto diretto dei rimedi omeopatici sui sistemi cellulari valutando i loro effetti *in vitro* sul metabolismo ossidativo di neutrofili in coltura attivati da peptidi formilati<sup>15</sup>. Questi risultati, basati sull'analisi di potenze multiple di una vasta serie di composti, possono essere riassunti in questo modo: a) *Manganum phosphoricum* 6x e 8x, *Magnesium phosphoricum* 6x e 8x, *Sulphur* 6x, *Acidum citricum* 3x; *Acidum succinicum* 3x e 4x mostravano un effetto inibitorio altamente riproducibile nel nostro sistema *in vitro*; b) *Acidum fumaricum* e *Acidum malicum* (tutti alla diluizione 4x) mostravano un discreto effetto potenziante sul metabolismo ossidativo; c) nel corso di vari esperimenti *Phosphorus* e *Magnesium phosphoricum* spesso hanno mostrato effetti inibitori anche a potenze piuttosto alte (oltre 15x) ma essi non apparivano sempre alle medesime diluizioni, rendendo difficile l'elaborazione statistica; comunque, raggruppando tutti i risultati riguardanti l'effetto delle alte potenze di *Phosphorus* (fino a 30x) è stato possibile identificare una piccola (10-15%) ma significativa inibizione dell'attivazione cellulare. Questi risultati suggeriscono che la maggioranza dei rimedi interferisca con meccanismi regolatori fini della cellula come i flussi ionici, i processi di fosforilazione e la riduzione ossidativa. Nella normale fisiologia cellulare il fosforo, lo zolfo, il magnesio, il manganese, il calcio e altri elementi giocano un ruolo fondamentale in tali meccanismi e ciò rende particolarmente interessante il fatto che alcuni rimedi omeopatici, come quelli saggiati, possano agire su tali livelli di controllo.

I granulociti neutrofili umani trattati con basse potenze (4x) di un estratto omeopatico vegetale (*Podophyllum peltatum*) presentavano effetti stimolatori specifici sulle loro risposte metaboliche: un incremento nella risposta ossidativa successiva alla stimolazione con formilpeptidi batterici<sup>16</sup>. Questo effetto di priming si verificava sul rilascio di anione superossido ( $O_2^-$ ) ed era quantitativamente simile all'effetto di priming del TNF- $\alpha$ . Il fenomeno è stato osservato con una preparazione omeopatica contenente, tra i vari componenti, estratto di *podophyllum* (*Podophyllum compositum*) ed una potenza omeopatica 4x del medesimo (la concentrazione finale del principio attivo era circa 0.025  $\mu\text{g/ml}$ ), mentre non si verificava alcun incremento di rilascio dell' $O_2^-$  dall'omeopatico *Podophyllum* 12x o dagli altri componenti contenuti nel complesso. La podofillotossina purificata causava lo stesso effetto alle dosi tra 0.1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , mentre dosi maggiori di 100  $\mu\text{g/ml}$  inibivano il burst respiratorio

that obtained using 10  $\mu\text{M}$  of dexamethasone and 0.1 mM of indomethacin. The same authors pointed out a considerable difference in individual sensitivity to these drugs, a problem previously highlighted by others who have investigated the effect of *Belladonna*, *Hepar sulfur*, *Pyrogenium*, *Silicea* and *Staphylococcinum* on chemotaxis and obtained conflicting results<sup>13</sup>.

Among plants another Cucurbitaceae family member has tested on neutrophil function: it has been reported (in a preliminary communication) that *Bryonia* 4CH and 9CH had a stimulatory effect on the oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes, which may be both direct and indirect (increasing the response to chemotactic peptides)<sup>14</sup>.

Our own group investigated the effects of homeopathic medicines on inflammatory cells and has obtained significant results particularly in relation to low potencies. In a first study we explored the possible direct effect of homeopathic medicines on cell systems by evaluating their *in vitro* effects on the oxidative metabolism of cultured neutrophils activated by formylated peptides<sup>15</sup>. These results, based on the analysis of multiple potencies of a large series of compounds, can be summarized as follows: a) *Manganum phosphoricum* 6x and 8x, *Magnesium phosphoricum* 6x and 8x, *Sulphur* 6x, *Acidum citricum* 3x; *Acidum succinicum* 3x and 4x showed highly reproducible inhibitory effects on our *in vitro* assay system; b) *Acidum fumaricum* and *Acidum malicum* (both at a dilution of 4x) showed a slightly potentiating effect on oxidative metabolism; c) during the course of various experiments, *Phosphorus* and *Magnesium phosphoricum* often showed inhibitory effects even at very high potencies (over than 15x), but these did not always appear at the same dilutions, thus making it difficult to analyse them statistically; however, by pooling all of the data concerning the effects of high *Phosphorus* dilutions (up to 30x), it has been possible to identify a small (10-15%) but statistically significant inhibition of cell activation. These results suggest that the majority of the tested remedies interfere with subtle cell regulatory mechanisms known to be based on ion exchanges, phosphorylation processes and reduced oxidation. In normal cell physiology, phosphorus, sulphur, magnesium, manganese, calcium and other elements play a major role in such mechanisms, and so it is particularly interesting that some homeopathic medicines can act at these levels of control.

Human blood neutrophilic granulocytes (neutrophils) treated with low potencies (4x) of a homeopathic drug extract (*Podophyllum peltatum*) had specific stimulating effects on their metabolic responses: an enhanced oxidative response to a subsequent challenge with bacterial formyl-peptides<sup>16</sup>. This priming effect was related to superoxide anion ( $O_2^-$ ) release (respiratory burst), and was quantitatively similar to the priming of the effect of TNF- $\alpha$ . The phenomenon was observed with a homeopathic preparation containing, among other things, *podophyllum* extract (*Podophyllum*

per cui la sostanza pura mostrava una tipica curva dose-risposta bifasica. Effetti simili venivano ottenuti con la colchicina purificata (1-1000  $\mu\text{g/ml}$ ), un agente disgregatore dei microtubuli. Inoltre, sia i composti derivati che la podofillotossina pura inibivano l'adesione cellulare alle superfici di piastre da microtitolo coattate con siero bovino. Questi risultati mostrano che basse diluizioni omeopatiche di fitoestratti possiedono specifici effetti stimolanti sull'attivazione del metabolismo dei neutrofili. L'interesse per questi rimedi deriva anche dal fatto che dosi ben più alte di podofillotossina vengono usate dalla farmacologia convenzionale per inibire la proliferazione cellulare e sembra che risultino efficaci contro i condilomi della pelle. Le dosi pre-stimolanti sono presenti nelle preparazioni omeopatiche, dosi inibitrici sono contenute nei farmaci allopatrici.

## BASOFILI

Sin dagli inizi della ricerca *in vitro* in omeopatia, il miglior modello in cui il fenomeno del simile e dell'efficacia della alte diluizioni è stato maggiormente studiato è la biologia dei basofili umani.

I primi risultati riportavano l'effetto di sostanze molto diluite (IgE, istamina) o di rimedi omeopatici (*Lung histaminum*, *Apis mellifera*) sulla degranulazione cellulare<sup>17-20</sup>. Il rilascio intracellulare dei granuli nei basofili stimolato dal legame al recettore con IgE o da altri agonisti rappresenta una manifestazione diretta dell'attivazione cellulare e sono stati fatti in passato molti tentativi per chiarire la dinamica della degranulazione e di comprenderne i meccanismi biologici<sup>21-24</sup>. L'attivazione cellulare implica modificazioni nei flussi ionici di membrana (in particolare degli ioni calcio), cambiamenti nella polarità di membrana e di altri meccanismi che eventualmente conducono all'esocitosi ed al rilascio di mediatori, come le citochine IL-3 o IL-13, di istamina, PAF e LTC<sub>4</sub>. È risaputo che uno dei principali mediatori è l'istamina, che viene prodotta dalla decarbossilazione dell'istidina, conservata nei granuli dei basofili e dei mastociti e rilasciata solo pochi secondi dopo lo stimolo.

L'istamina agisce come un regolatore a valle interagendo con i recettori H<sub>2</sub> e inibendo in questo modo il rilascio di mediatori e la degranulazione nel basofilo.

Inizialmente l'effetto di sostanze altamente diluite/dinamizzate veniva valutato osservando il meccanismo di degranulazione con la microscopia ottica ma i falsi positivi metacromatici non potevano essere esclusi del tutto e potevano influenzare significativamente il risultato finale delle prove *in vitro*<sup>25</sup>. Inoltre, se si usano stimoli deboli o agonisti a dosi molto basse l'attivazione dei basofili senza reale degranulazione (cioè senza il rilascio di istamina) è stata osservata in diversi casi<sup>26</sup>.

Progressi nel sistema sperimentale che ha come modello l'attivazione del basofilo sono emersi in modo indipendente dalla ricerca immunologica impegnata alla messa in piedi di uno strumento analitico in grado di diagnosticare le affezioni allergiche. La valutazione della degranulazione è stata sostituita dalla citometria a flusso. Sono state riportate

*compositum*) and a 4x homeopathic potency of *Podophyllum* (the final concentration of the active principle was about 0.025  $\mu\text{g/ml}$ ), whereas no enhancement of  $O_2^-$  release was caused by homeopathic *Podophyllum* 12x or the other components contained in the complex homeopathic preparation. Purified podophyllotoxin caused the same effect at doses of 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ , whereas doses of more than 100  $\mu\text{g/ml}$  inhibited the respiratory burst so that pure toxin showed a typical bi-phasic dose-response curve. Similar effects were obtained with purified colchicine (1-1000  $\mu\text{g/ml}$ ), a microtubule-disrupting agent. Furthermore, both homeopathic *podophyllum*-derived compounds and pure podophyllotoxin inhibited cell adhesion to the serum-coated surface of culture microplates. These results show that low potencies of a homeopathic drug extract have stimulant-specific effects on the activation of neutrophil metabolism. Interest in this drug also comes from the fact that much higher doses of podophyllotoxin are used by conventional pharmacology to inhibit cell proliferation and appear to be efficacious against condylomata of the skin. Priming doses are those contained in the homeopathic preparation, toxic doses are those contained in the allopathic preparation.

## Basophils

Since the beginning of *in vitro* research, the best studied laboratory model in which the phenomena of similarity and of high dilution effects have been most widely investigated is the biology of human basophils. Early evidence reported the effect of highly diluted/dynamized substances (IgE, histamine) or homeopathic remedies (*Lung histaminum*, *Apis mellifera*) on cellular degranulation<sup>17-20</sup>. Intracellular granule release triggered by the interaction with IgE-receptor or by other agonists represents a direct manifestation of cellular activation and many attempts to assess the dynamics of degranulation event and to understand its biological mechanism have been made<sup>21-24</sup>. Cellular activation involves changes in membrane ion fluxes (particularly calcium ions), changes in cell membrane electrical polarity, and other mechanisms that eventually lead to exocytosis and the release of mediators, such as the cytokines IL-3 or IL-13, histamine, PAF and LTC<sub>4</sub>. It is well known that one of the main mediators is histamine, which is produced by the decarboxylation of histidine, stored in granules of basophils and mast cells, and released only a few seconds after activation. Histamine acts as a downstream regulator by interacting with H<sub>2</sub>-receptors and thus inhibiting basophil release of mediators and degranulation.

Initially the effects of highly diluted/dynamized substances on basophil activation were evaluated by observing the degranulation with optical microscopy but metachromatic false positive results could not be prevented at all and they might influence significantly the resulting outcome of the *in vitro* evaluations<sup>25</sup>. Moreover, when weak stimuli or very low agonist doses are used the activation of

evidenze che l'istamina altamente diluita è capace di influire sulla espressione di membrana del CD63 e del CD203c in basofili stimolati con fMLP o anti-IgE.

Questi marcatori sono espressi sulla membrana dei basofili attivati: il CD63, una tetraspanina, conosciuta anche come LAMP-3, è quasi assente nei basofili a riposo (non attivati) e viene espressa dopo una stimolazione. La proteina è conservata in granuli intracellulari per cui la sua espressione in membrana è associata alla degranolazione. CD203c, noto come ENPP-3, è un ectoenzima, ed è espresso costitutivamente anche dalle cellule a riposo e sovra-espresso dopo un preciso stimolo. CD203c è altamente specifico dei basofili e può essere usato anche come marker fenotipico.

Gli effetti più vistosi sono stati osservati con istamina altamente diluita e dinamizzata 15CH e 16CH sull'espressione del CD203c quando i basofili venivano attivati con dosi relativamente basse di anti-IgE tra 0,5 ed 1,0 µg/ml<sup>27, 28</sup>, e questi dati hanno mostrato una correlazione con i saggi di degranolazione usando alcian blu come colorante<sup>27</sup>. Lo schema di inibizione su tutto l'intervallo di dosi andava dal 2CH al 40CH ed ha mostrato sia effetti inibitori sull'attivazione del basofilo coinvolgendo tutte le diluizioni centesimali da 14CH a 18CH<sup>27</sup> sia effetti puntuali correlate solo a certe potenze<sup>27, 29, 30</sup>.

E' stata eseguita anche un'analisi multicentrica per verificare questi risultati<sup>27</sup> ma non tutti i ricercatori sono stati in grado di confermarli applicando le medesime condizioni sperimentali<sup>31</sup>: gli effetti potrebbero essere correlati a diverse variabili sperimentali<sup>32-34</sup>, e sono stati riportati sia effetti inibitori che effetti stimolatori<sup>30</sup>.

Di recente, anche il nostro gruppo di ricerca ha iniziato ad investigare l'effetto di alte diluizioni di istamina sullo stesso modello sperimentale. I primi risultati, seppure di natura preliminare, sembrano confermare l'esistenza del fenomeno.

La Figura 1 riporta il rapporto % dell'effetto di varie preparazioni diluite/dinamizzate di istamina contro le stesse diluizioni seriali preparate solo con acqua. L'espressione di membrana del CD203c è stata valutata misurando l'intensità media di fluorescenza (MFI) ed i valori di MFI dei basofili attivati pre-trattati solo con le diluizioni di acqua (senza istamina) sono stati considerati come il 100% (controllo). Le potenze 2CH, 13CH e 14CH hanno mostrato una inibizione significativa rispetto al controllo dell'espressione di membrana del CD203c dopo attivazione con anti-IgE. La significatività è stata valutata con un test non parametrico (Kolmogorov-Smirnov).

## PROSPETTIVE FUTURE

Il grosso delle evidenze suggerisce che l'analisi *in vitro* riguardante i composti altamente diluiti/dinamizzati sulla funzione del granulocita potrebbe gettare una luce sulla complessità dei sistemi biologici che rispondono a preparazioni omeopatiche in acqua, un tema che non può più essere rapportato alla semplice spiegazione di un effetto placebo<sup>35, 36</sup>. In un simile contesto la ricerca sul comportamento dell'acqua metterebbe a fuoco una possi-

basophils without true degranulation (i.e. without histamine release) has been observed under many circumstances<sup>26</sup>.

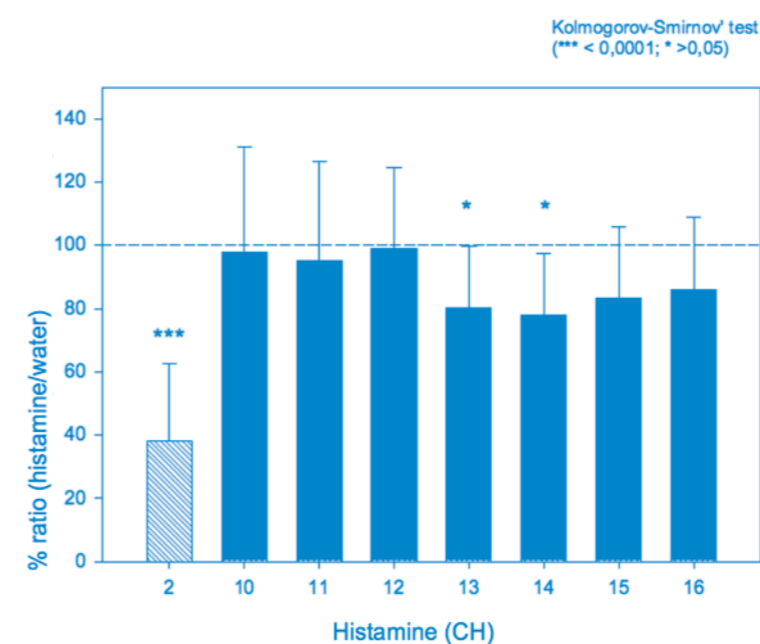
Progress in the experimental setting concerning the human basophil activation arose from independent immunology research groups endeavoured to build up an analytical tool to diagnose allergy affections. Degranulation tests have been replaced by flow cytometry. Evidence was reported that highly diluted histamine is able to affect CD63 and CD203c up-regulation in fMLP and anti-IgE stimulated basophils.

These markers are expressed on the membrane of activated basophils: the CD63, a tetraspanin, known also as lysosome-associated membrane protein (LAMP-3), is very low expressed in resting (non activated) basophils and up-regulated following stimulation. The protein is stored inside the intracellular granules, so its membrane displacement can be related to degranulation. CD203c, known as ENPP-3, is an ectoenzyme, constitutively expressed also by resting cells and up-regulated following stimulation. CD203c is highly specific of basophilic cells and could be used also as a phenotyping marker.

The highest effects are observed with 15CH or 16CH highly diluted/dynamized histamine on CD203c expression when basophils were triggered with relatively low doses of anti-human IgE ranging from 0,5-1,0 µg/ml<sup>27, 28</sup>, and these data have shown a correlation with degranulation assay by alcyan blue staining<sup>27</sup>. The inhibition pattern throughout the high dilution interval spanning from 2CH to 40CH has shown either an inhibitory effects on basophil activation involving all the centesimal dilutions ranging from 14CH to 18CH<sup>27</sup> or punctual effects related only to certain potencies<sup>27, 29, 30</sup>. Multicentre analysis have been performed to assess these results<sup>27</sup> but not all the researchers were able to confirm them by applying the same experimental setting<sup>31</sup>: effects might be related to various experimental variables<sup>32-34</sup>, and both inhibitory and stimulatory effects were reported<sup>30</sup>.

Recently, also our own research group has undertaken a study project aiming at investigating the effect of highly diluted/dynamized histamine aqueous solutions on the same experimental model. Early results, albeit preliminary in nature, seem to confirm the existence of the phenomenon.

Figure 1 reports the ratio % of the effect of various diluted/dynamized histamine preparations vs the same serially dilutions prepared only with pure H<sub>2</sub>O (no histamine). CD203c membrane expression was evaluated by the mean fluorescence intensity (MFI) and MFI related to activated basophils pre-treated with diluted/dynamized preparations of simple water (without histamine) were reported as basal 100% (control). The hahnemannian potencies 2CH, 13CH and 14CH showed a statistically significant inhibition of CD203c membrane expression following anti-IgE activation, when compared to the control. Significativity was evaluated by a Kolmogorov-Smirnov non parametric test.



bile teoria esplicativa per descrivere i meccanismi con cui le sostanze altamente diluite agiscono sulla funzione cellulare<sup>37-39</sup>. Comunque, ci sono ancora da affrontare numerose domande, deve essere completata la valutazione statistica e devono essere confermati numerosi dati.

Alcune evidenze, ad esempio, hanno riportato il ruolo della succussione-dinamizzazione sui composti altamente diluiti in acqua<sup>40</sup> o anche il ruolo delle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua diluita<sup>41, 42</sup>.

Un campo di discussione promettente potrebbe avere origine dalla biologia molecolare del segnale intracellulare, dallo studio dell'acqua intracellulare e dell'acqua "vicina" (includendo le interazioni di quest'ultima con le strutture biologiche)<sup>43</sup> e delle proprietà fisiche dell'acqua altamente diluita/dinamizzata.

Per comprendere questi fenomeni dovrebbe essere prescelto un approccio interdisciplinare agli studi clinici: in tal modo la ricerca di base consente di attingere nuovi suggerimenti dalla ricerca di base e dunque di confermare il ruolo dell'omeopatia tra le scienze mediche.

## Ringraziamenti

Questo lavoro è stato reso possibile grazie al contributo del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e dall'azienda Boiron Laboratoires s.r.l..

## BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. VAN WIJK R, ALBRECHT H. Classification of systems and methods used in biological basic research on homeopathy. Homeopathy 2007;96:247-51.

## EFFETTO DI ALTE DILUZIONI DI ISTAMINA SU BASOFILI UMANI ATTIVATI CON ANTI-IGE.

I valori indicati rappresentano il rapporto percentuale  $\pm$  DS tra la fluorescenza del CD203c dei basofili trattati per 10 min a 37°C con diluizioni seriali centesimali dinamizzate di istamina (5 esperimenti separati in triplicato) e la fluorescenza del CD203c dei basofili trattati nelle stesse condizioni ma con diluizioni seriali centesimali dinamizzate di sola H<sub>2</sub>O (2 esperimenti separati in triplicato). Analisi statistica eseguita con il test di Kolmogorov-Smirnov (\*\*\*) < 0,0001; \* < 0,05)

## Effect of highly diluted histamine solutions on human basophil triggered with anti-IgE.

Values refer to the ratio  $\pm$  SD between CD203c fluorescence of basophils treated for 10 min at 37°C with serial centesimal succussed dilutions of histamine (5 separate triplicate experiments) and CD203c fluorescence of basophils treated at the same condition but with serial centesimal succussed dilutions of pure water as control (2 separate triplicate experiments). Statistical analysis was performed by applying the Kolmogorov-Smirnov non parametric test (\*\*\*) < 0,0001; \* < 0,05).

## Future perspectives

The overall bulk of evidence suggests that *in vitro* investigation about highly diluted/dynamized compounds on granulocyte function could throw a light on the complexity of biological systems responding to homeopathic aqueous preparations, an issue that cannot be related any longer to a placebo explanation<sup>35, 36</sup>. In this context research about water structure and behaviour should focus a possible suggestive hypothesis able to explain the mechanism by which high diluted substances act on cell function<sup>37-39</sup>.

However many questions are still to be faced statistical evaluation has to be definitely assessed, and several data have to be confirmed. Few evidence reported, for instance, the role of succussion-dynamization on water high diluted compounds<sup>40</sup> or the role of the physico-chemical features of diluted water<sup>41, 42</sup>. A promising discussion arena could arise from molecular biology of cell signaling systems, intracellular and vicinal-water (including its interaction with biological structures)<sup>43</sup> and physical properties of highly diluted/dynamized water.

An interdisciplinary approach should be preferred in order to comprehend how and why homeopathy works. Such an attitude allows clinical studies to draw new suggestions from basic research and hence to confirm the role of homeopathy inside medical sciences.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica and from Boiron Laboratoires s.r.l.



2. BELLAVITE P, CONFORTI A, PONTAROLLO F, ORTOLANI R. *Immunology and homeopathy. 2. Cells of the immune system and inflammation*. Evid Based Complement Alternat Med 2006 Mar;3(1):13-24.
3. WITT CM, BLUTH M, ALBRECHT H, WEISSHUHN TE, BAUMGARTNER S, WILLICH SN. *The in vitro evidence for an effect of high homeopathic potencies – A systematic review of the literature*. Complement Ther Med 2007 Jun;15(2):128-38.
4. SEITCHECK R. *Granulocyte reactions after homeopathic high potencies*. Br Hom J 1962;51(2):111-2.
5. DOUCH G. *Granulocyte reactions after homeopathic potencies*. Br Hom J 1966;55(2):96-8.
6. FANSELOW G. *Influence of plant extracts Echinacea purpurea, Clematis, Aristolochia and homeopathic remedies (Acidum formicum, Sulphur) on phagocytic activity of human granulocytes in vitro*. Thesis, Facult Mediz-Munchen 1984.
7. EDWARD MD, Whitmont C. *Aristolochia clematis*. Br Hom J 1958;47:97-9.
8. DOUCH G. *ARISTOLOCHIA. A dangerous medicine*. Br Hom J 1985;74(115):118.
9. MENGES U. *Acute toxicity of aristolochic acid in rodents*. Archives of Toxicol 1987 Feb;59(5):328-31.
10. CHIRILA M, OLINESCU A. *The effect of Ecballum elaterium juice and its homeopathic dilutions on oxidative bursts of human polymorph neutrophils*. Br Hom J 2000;89(1):S64.
11. HILPERT K, WESSNER K, SCHNEIDER-MERGENER J, WELFLE K, et al. *Design and Characterization of a Hybrid Mini-protein That Specifically Inhibits Porcine Pancreatic Elastase*. J Biol Chem 2003;278(27):24986-93.
12. POITEVIN B, AUBIN M, ROYER JF. *Effet de belladonna et ferrum phosphoricum sur la chemiluminescence des polynucleaires neutrophiles humains*. Ann Homeopath Franc 1983;3:5-12.
13. MOSS VA, ROBERTS JA, SIMPSON HKL. *The action of "low potency" homeopathic remedies on the movement of guinea pig macrophages human leukocytes*. Br Hom J 1982;71:48-61.
14. FLETCHER MP, HALPERN GM. *Effects of dilutions of Bryonia (4-9CH) and lung-histamine (4-9CH) on human neutrophil (PMN) activation responses as assessed by flow cytometry*. in 2nd GIRI Meeting 1988;Monte Carlo(A20).
15. CHIRIMBOLO S, SIGNORINI A, BIANCHI I, LIPPI G, BELLAVITE P. *Effects of homeopathic preparations of organic acids and minerals on the oxidative metabolism of human neutrophils*. Br Hom J 1993;82(4):237-44.
16. CHIRIMBOLO S, CONFORTI A, LUSSIGNOLI S, METELMANN H, BELLAVITE P. *Effects of Podophyllum peltatum compounds in various preparations and dilutions on human neutrophil functions in vitro*. Br Hom J 1997;86(1):16-26.
17. POITEVIN B, AUBIN M, BENVENISTE J. *Effect d'Apis Mellifica sur la degranulation des basophiles humains in vitro*. Homeopat Franc 1985;73:193-8.
18. SAINTE-LAUDY J, LAURENT J, LAGRUE G. *[Diagnostic value of the human basophil degranulation test. Value of passive transfer]*. Presse Med 1984 Oct 27;13(38):2326.
19. DAVENAS E, BEAUVAIS F, AMARA J, OBERBAUM M, ROBINZON B, MADONNA A, ET AL. *Human basophil degranulation triggered by very diluted antiserum against IgE*. Nature 1988 Jun 30;333:816-8.
20. POITEVIN B, DAVENAS E, BENVENISTE J. *In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by lung histamine and Apis mellifica*. Br J Clin Pharmacol 1988;25(4):439-44.
21. HADJAJ B, CHERRUUAULTY, SAINTE-LAUDY J. *Control of basophil degranulation*. Int J Bio-Med Comput 1993;32(2):151-9.
22. NROBETCHOU F, CHERRUUAULTY, SAINTE-LAUDY J. *A non-linear compartmental model of human basophil activation*. Int J Bio-Med Comput 1994;36:293-8.
23. HADJAJ B, CHERRUUAULTY, SAINTE-LAUDY J. *Basophil degranulation control*. Int J Bio-Med Comput 1992;31(2):89-97.
24. SAINTE-LAUDY J. *Standardization of basophil degranulation for pharmacological studies*. J Immunol Methods 1987 Apr 16;98(2):279-82.
25. BEAUVAIS F, BIDEF B, DESCOURS B, HIEBLOT C, BURDIN C, BENVENISTE J. *Regulation of human basophil activation. I. Dissociation of cationic dye binding from histamine release in activated human basophils*. J All Clin Immunol 1991;87:1020-8.
26. KNOL E, MULF F, KUJIPERS T, VERHOEVEN A, ROOS D. *Intracellular events in anti-IgE activated non releasing human basophil*. J All Clin Immunol 1992;90:92-103.
27. BELON P, CUMPS J, ENNIS M, MANNAIONI PF, ROBERFROID M, SAINTE-LAUDY J, et al. *Histamine dilutions modulate basophil activation*. Inflamm Res 2004 May;53(5):181-8.
28. ainte-LAUDY J, BELON P. *Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions. A novel basophil specific marker: CD 203c*. Homeopathy 2006 Jan;95(1):3-8.
29. BROWN V, ENNIS M. *Flow-cytometric analysis of basophil activation: inhibition by histamine at conventional and homeopathic concentrations*. Inflamm Res 2001 Apr;50 Suppl 2:S47-S48.
30. SAINTE-LAUDY J. *Stimulatory effect of high dilutions of histamine on activation of human basophils induced by anti-IgE*. Inflamm Res 2001 Apr;50 (suppl.2):S63-S64.
31. GUGGISBERG AG, BAUMGARTNER SM, TSCHOPP CM, HEUSSER P. *Replication study concerning the effects of homeopathic dilutions of histamine on human basophil degranulation in vitro*. Complement Ther Med 2005 Jun;13(2):91-100.
32. BELON P, CUMPS J, ENNIS M, MANNAIONI PF, SAINTE-LAUDY J, ROBERFROID M, et al. *Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a European multi-centre trial*. Inflamm Res 1999 Apr;48 Suppl 1:S17-S18.
33. LORENZ I, SCHNEIDER EM, STOLZ P, BRACK A, STRUBE J. *Sensitive flow cytometric method to test basophil activation influenced by homeopathic histamine dilutions*. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd 2003 Dec;10(6):316-24.
34. LORENZ I, SCHNEIDER EM, STOLZ P, BRACK A, STRUBE J. *Influence of the diluent on the effect of highly diluted histamine on basophil activation*. Homeopathy 2003 Jan;92(1):11-8.
35. BELLAVITE P. *Complexity science and homeopathy: a synthetic overview*. Homeopathy 2003 Oct;92(4):203-12.
36. BELLAVITE P, PITARI G, ITALIANO M. *Homeopathy and placebo*. Homeopathy 2006 Jan;95(1):51.
37. CHAPLIN M. *The memory of water: an overview*. Homeopathy 2007;96(3):143-50.
38. MILGROM LR. *The memory of water regained?* Homeopathy 2003;92:223-4.
39. MILGROM LR. *Is homeopathy possible?* J R Soc Health 2006 Sep;126(5):211-8.
40. ORRES. *On the physical basis of succussion*. Homeopathy 2002;91(4):221-4.
41. REY L. *Can low-temperature thermoluminescence cast light on the nature of ultra-high dilutions?* Homeopathy 2007 Jul;96(3):170-4.
42. ELIA V, NAPOLI E, GERMANO R. *The 'Memory of Water': an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions*. Homeopathy 2007 Jul;96(3):163-9.
43. DASHNAU JL, CONLIN LK, NELSON HCM, VANDERKOOI JM. *Water structure in vitro and within Saccharomyces cerevisiae yeast cells under conditions of heat shock*. Bioch Biophys Acta 2008;1780(1):41-50.