

## Il modello dei basofili nello studio delle alte diluizioni dinamizzate: nuove evidenze di laboratorio

### RIASSUNTO

Il dibattito scientifico sul fenomeno della permanenza di un'attività farmacologica in soluzioni altamente diluite e dinamizzate non sembra essersi concluso con la nota vicenda apparsa sulla rivista Nature nel 1988 (la storia della cosiddetta "memoria dell'acqua"): da allora sono stati sviluppati numerosi modelli di laboratorio per verificare se diluizioni di un composto bio-attivo spinte oltre il numero di Avogadro siano in grado di suscitare un'attività biologica misurabile. Il più solido di questi modelli è rappresentato dall'inibizione del mediatore vasoattivo istamina sui basofili umani. In questo modello diluizioni centesimali successe di istamina in acqua tali da abbassare la concentrazione - anche fino a valori teorici inferiori a  $10^{-23}$  mol/L - sono in grado di inibire significativamente l'attivazione dei basofili in vitro. L'azione inibitoria è specifica poiché viene bloccata da H2-antagonisti come la cimetidina e non si verifica con analoghi inattivi dell'istamina. Numerosi problemi di riproducibilità e di standardizzazione non hanno consentito di dare la giusta risonanza al fenomeno osservato dai diversi gruppi di ricerca. I protocolli usati dai diversi gruppi non sempre sono stati confrontabili, gli studi multicentrici hanno presentato diverse variabili critiche e l'attività delle alte diluizioni ha manifestato anche dati apparentemente discordanti. I problemi principali hanno riguardato, oltre che la metodologia di identificazione dei basofili e il livello qualitativo dei reagenti, anche l'inclusione di replicati di controllo con solo solvente, la standardizzazione dei metodi di dinamizzazione e la scelta dei più adeguati parametri di valutazione. Il nostro gruppo

di ricerca è riuscito a dimostrare che l'istamina 12C, 14C, 15C e 16C inibisce significativamente l'attivazione cellulare mentre diluizioni assolutamente simili ma fatte da sola acqua dinamizzata non hanno riportato alcun effetto. Questi risultati consolidano fortemente le prove che il solvente (acqua e gas o ioni in essa disciolti) conserva l'informazione molecolare di un principio attivo da cui sono state eseguite diluizioni seriali fino a superare il cosiddetto numero di Avogadro e spingono a continuare gli studi biofisici e biologici sull'acqua liquida e sul suo ruolo nella funzione cellulare.

### PAROLE CHIAVE

Basofili-Memoria dell'acqua-Alte diluizioni-Istamina-Citofluorimetria

### SUMMARY

Here we describe our recent results in the context of current literature within the field of the biological activity of high dilutions. The debate around the pharmacological properties of ultra-diluted drugs (see the snappy term "memory of water") has not still found its definitive conclusion since the appearance of Benveniste's famous article on the journal "Nature" in 1988; since then a great bulk of in vitro evidence was reported to verify if aqueous dilutions beyond the Avogadro's limit were able to exert a reliable and reproducible biological action. An effective model to show clues about high dilution efficacy was developed by studying histamine inhibition of basophil function.

With this approach succeeded histamine dilutions beyond  $10^{-23}$  mol/L were able to inhibit basophil activation as evaluated by a flow cytometry assay. H2-antagonists such as cimetidine and inactive analogues to histamine prevented this inhibitory effect. Possibly due to concerns on reproducibility and standardization current pharmacological literature overlooked the importance of these results. Non comparable protocols, criticism in multicenter analysis and effects scattered on different dilutions were the main problems to face. Further experimental points of discussion were identified in the basophil separation approach by flow cytometry, the water controls, the succussion methods and the proper choice to monitor analytical parameters. Recently, our research group has succeeded into showing that histamine 12C, 14C, 15C and 16C inhibit significantly cell activation while water parallel dilutions, made by applying the same methodological criteria, were totally ineffective. These results enforce the evidence according to which liquid water, possibly with dissolved ions and gas nanobubbles, is able to retain a bio-informative nature though the molar solute is theoretically absent due to serial dilutions with the same solvent in a range where the Avogadro's threshold is passed through. The results here reported encourage research about the nature of liquid water and address to further evidence about its role inside the cell and in biological systems.

### KEYWORDS

Basophils-Water-High dilutions-Histamine-Flow cytometry

«There are more things in heaven and earth, Horatio, than are dreamt of in your philosophy». Hamlet Act 1, scene 5

### INTRODUZIONE

In questo lavoro si illustrano i recentissimi risultati ottenuti dal nostro gruppo, inserendoli nel contesto delle problematiche della ricerca nel campo dei basofili umani e più in generale della letteratura corrente sulle alte diluizioni/dinamizzazioni.

### Il contesto scientifico

Tra le varie "anomalie" dell'acqua liquida, oggetto di ampie discussioni, esiste il fenomeno per il quale una soluzione in acqua di un composto con azione biologica manterrebbe le sue proprietà farmacologiche anche quando la stessa soluzione venisse sottoposta ad una serie crescente di diluizioni seriali fino alla costituzione di un sistema chimico la cui concentrazione teorica del soluto è nulla, poiché è stato superato il cosiddetto numero di Avogadro, pari a circa  $6,022 \times 10^{23}$  molecole/litro di una soluzione 1 M (1M=soluzione contenente un numero di grammi pari al peso molecolare della sostanza in un litro di soluzione). Per descrivere tale paradossale proprietà sono stati formulati i termini "memoria dell'acqua" (1;2), "proprietà farmacodinamica dell'acqua" (3) o "effetto alta-diluizione" (4). In termini omeopatici, se si diluisce serialmente di cento volte (diluizione centesimale:  $10^2$ ) una soluzione di partenza (Tintura Madre) in cui il principio attivo abbia la concentrazione di 1,0 M (equivalente al peso molecolare espresso in grammi sciolto in un litro),



Il gruppo veronese autore della ricerca. Da sinistra: Salvatore Chirumbolo, Paolo Magnani, Marta Marzotto, Riccardo Ortolani, Paolo Bellavite, Antonio Vella.

sono sufficienti circa una dozzina di passaggi ( $12C = 10^{2 \times 12} = 10^{24}$ ) per ottenere un sistema chimico praticamente costituito dal solo solvente. Che questa "diluizione" e le eventuali successive mantengano le proprietà informazionali tipiche del soluto nelle concentrazioni precedenti è motivo di incredulità per il senso comune ma l'esistenza in letteratura di numerose prove biologiche e biofisiche (5) circa la natura bio-informazionale delle alte diluizioni renderebbe legittimo il dibattito scientifico su quelli che possono essere considerati veri e propri temi di frontiera, in cui, fra l'altro, brillano anche vari gruppi di ricerca italiani (6-10). Il contributo del gruppo di Elia in tal senso è significativo in quanto ha riportato significative differenze nelle proprietà chimico-fisiche basali (pH, conducibilità, calorimetria) delle alte diluizioni, riprendendo il concetto di Prigogine sui sistemi dissipativi e applicandolo anche alle diluizioni in acqua oltre il numero di Avogadro

(11;12). L'aspetto che maggiormente salta all'occhio dell'osservatore inesperto quando si parla di alte diluizioni è la diminuzione della densità del soluto in acqua; tuttavia, la massa molare e la natura dell'acqua aggiunta ad una diluizione devono probabilmente giocare un ruolo più importante di quello che non si ritiene ancora. In questo contesto la chimica analitica utilizza terminologie esotiche per indicare composti presenti in soluzione a  $10^{-18}$  M (attomole),  $10^{-21}$  M (zeptomole) e  $10^{-24}$  M (yoctomole) e quindi lo spazio di indagine prossimo al limite di Avogadro non è così inusuale in farmacologia e in analisi. Le moderne tecniche analitiche arrivano alle attomoli/L di sostanza ma recentemente sono state messe in piedi tecnologie in grado di spingersi ben oltre e di raggiungere lo spazio delle yoctomoli/L (13;14). Appare evidente che le prove sperimentali riguardanti l'effetto delle alte diluizioni di un composto anche oltre la soglia di Avogadro, costringono a una re-

Dipartimento di Scienze Morfologiche e Biomediche – Università di Verona.

\* Azienda Ospedaliera di Verona, Servizio di Immunologia Clinica.

\*\* Dipartimento di Scienze Statistiche "Paolo Fortunati" – Università di Bologna.

visione critica delle teorie stocastiche che descrivono le relazioni ligando-recettore (15) e in ultima analisi persino le leggi fisiche (quantistiche) della materia condensata (16;17): ad ogni modo, se l'evidenza sperimentale è in contraddizione con un modello teorico seppure consolidato è quest'ultimo che deve cedere il passo ad una modifica.

## Il modello biologico

In una precedente rassegna (18) è stato descritto come il modello biologico dello studio dei leucociti umani sia diventato uno dei settori di indagine più promettenti per la verifica del funzionamento delle alte diluizioni. Numerose altre pubblicazioni del settore hanno illustrato i diversi modelli cellulari, animali e vegetali usati per lo studio delle alte diluizioni e dei rimedi omeopatici (10;19-22), dando prova che l'efficacia delle alte diluizioni di un composto biologicamente attivo non è attribuibile ad un effetto "placebo" (23). Uno dei modelli su cui si è maggiormente concentrato lo studio delle proprietà farmacodinamiche delle alte diluizioni è il modello istamina-basofilo. L'istamina è un'ammina vasoattiva ed è il principale mediatore chimico dell'infiammazione allergica (24). I mastociti nei tessuti così come i basofili nel sangue periferico possiedono dei recettori  $H_2$  in grado di legare l'istamina la quale, in questo modo, esercita un ruolo retroattivo sulle cellule stesse, inibendone perciò la caratteristica degranulazione con il rilascio di mediatori chimici e l'espressione sulla membrana di particolari molecole considerati marcatori tipici dello stato di attivazione cellulare (25). Tra questi marcatori i più noti tra gli addetti ai lavori sono il CD63 ed il CD203c. Quando i basofili vengono attivati in vitro da agonisti solubili, come peptidi chemiotattici di derivazione bat-

terica (ad esempio l'fMLP) o anticorpi anti-IgE, l'espressione di questi marcatori aumenta. È possibile monitorare questo incremento attraverso una tecnica molto sofisticata che è la citometria a flusso. Allo stesso modo il sistema di saggio può monitorare l'effetto inibitorio o stimolatorio di una qualsiasi sostanza, come ad esempio l'istamina, sull'attivazione cellulare valutando il decremento o l'incremento dell'espressione di questi marcatori. In anni passati l'attivazione del basofilo veniva valutata in microscopia ottica attraverso la scomparsa della colorazione metacromatica con blu alcian o di toluidina a causa di un processo di modifica fisico-chimica dei granuli cromatici. Le evidenze riportate dalla letteratura ufficiale in merito all'efficacia di diluizioni acquose di istamina oltre la 12C sui basofili sono state pubblicate da autori come Cherruault (26), dal gruppo di Sainte-Laudy e Belon (27-37), da Brown ed Ennis (38), da Lorenz (39) mentre altri gruppi non sono riusciti a replicare i risultati (40). In tale contesto si è recentemente inserito anche il nostro gruppo di lavoro, per cercare di chiarire definitivamente l'esistenza del fenomeno, standardizzando le metodiche laboratoristiche ad un livello di eccellenza (41).

## Problematiche tecniche e ripetibilità

La Tabella 1 riassume tutti i principali lavori pubblicati sul settore: alcune evidenze, le prime da un punto di vista storico, sono state descritte analizzando la degranulazione cellulare. Il gruppo francese di Sainte-Laudy e Belon (31;34) e quello italiano di Chirumbolo e Bellavite (41) hanno pubblicato dei lavori *in extenso* come original research papers. La Tabella 1 riporta anche l'evidenza che sia stato senza dubbio merito dei francesi

l'aver introdotto la citometria a flusso che ha sostituito il test di degranulazione. Tuttavia il brillante lavoro di Belon del 2004 non è un multicentrico su un unico protocollo ma illustra i risultati di tre tipi di studi con una partecipazione non immediatamente comparabile dei diversi laboratori: il primo studio è un multicentrico sulla degranulazione e quindi metodologicamente ha maggiori criticità rispetto alla più precisa citometria a flusso e inoltre non è direttamente confrontabile con gli altri studi pubblicati che usano ampiamente i metodi citofluorimetrici, il secondo è un multicentrico che usa un metodo anti-IgE/CD63 ma coinvolge solo 3 laboratori e non offre i risultati sul marcatore CD203c e il terzo è l'unico che riguarda un singolo laboratorio (il laboratorio 4) ed usa solo il test del rilascio di istamina. Alcuni lavori non descrivono i risultati relativi all'impianto di un controllo in parallelo con diluizioni succusse fatte di solo solvente ma si limitano a citare l'esistenza di un controllo con sola acqua (35;37) o non lo indicano affatto (27;30;36) ovvero non viene descritto il confronto tra diluizioni di istamina e diluizioni di acqua sottoposte a medesimo trattamento, descrivendo cioè il numero e la tipologia dei campioni messi a confronto, il processo di dinamizzazione e le statistiche relative, se si eccettua il lavoro di Belon che però riguarda solo lo studio della degranulazione (34): quindi questo è un dato che in letteratura andava chiarito. Data l'estrema complessità del fenomeno e la conseguente variabilità nella riproducibilità dei dati con le medesime condizioni sperimentali, una parola chiara quindi poteva essere detta coinvolgendo sullo stesso protocollo in cieco più laboratori o anche ripetendo gli esperimenti in modo molto controllato in un singolo laboratorio con un singolo metodo standardizzato e dal

medesimo operatore e includendo rigidi controlli in parallelo con diluizioni succusse di sola acqua. In realtà, una serie notevole di risultati in diversi centri ha prodotto un unico lavoro sistematico (34), il quale sfortunatamente ha il difetto di comparare più metodi diversi, attribuendo maggiore

risalto ai risultati sul test di degranulazione rispetto a quelli più standardizzati e precisi delle analisi citofluorimetriche. In effetti sono stati pubblicati anche dati discordanti, come ad esempio quelli relativi ad una attività paradossale stimolatrice dell'istamina 13C sul CD63 (33), inibizioni

alle diluizioni 15C e 16C (29) oppure alle 10C e 13C (38). Uno dei problemi chiave di questi risultati è dunque la ripetibilità sperimentale di effetti così fini e questo potrebbe spiegare, almeno in parte, l'inadeguata attenzione al fenomeno nella letteratura scientifica di massimo livello.

Tabella 1. Lavori riguardanti l'effetto dell'istamina in alte diluizioni/dinamizzazioni sui basofili umani pubblicati nella letteratura scientifica

Anno/Autore (citazione)	PRINCIPALI ASPETTI METODOLOGICI				RISULTATI			
	Diluizioni/dinamizzazioni testate	Tipo di succussione	Controllo con acqua "dinamizzata" (si/no)	Protocollo/ Parametri misurati	Statistica	Dosi molecolari attive	Potenze corrispondenti dichiarate	Note
Cherruault 1989 (26)	4C-20C (10 <sup>-8</sup> M-10 <sup>-40</sup> M), acqua non specif.	Non specif.	Non indicato	Microscopia ottica (*)	Non indicata	10 <sup>-10</sup> -10 <sup>-17</sup> M e 10 <sup>-30</sup> -10 <sup>-38</sup> M	5C-9C e 15C-19C	Ext. franc.
Sainte-Laudy 1993 (27)	10 <sup>-14</sup> M-10 <sup>-38</sup> M, acqua non specif.	Non specif.	Non indicato	Microscopia ottica (*)	t-test	10 <sup>-16</sup> -10 <sup>-22</sup> M e 10 <sup>-36</sup> M	Non indicato	Suppl.
Sainte-Laudy, 1996 (30)	1C-20C, distilled water	Vortex	Non indicato	B; CD63%	Wilcoxon	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-22</sup> M, 10 <sup>-34</sup> M	Non indicato	Suppl.
Belon, 1999 (31)	15C-19C, acqua distillata	Vortex	Si ma non dettagliato	Microscopia ottica (*)	GLM multivar, Kruskal-Wallis	Non indicato	15C-19C	Ext. MC
Sainte-Laudy, 2000 (32)	10C-20C, acqua di rubinetto	Vortex	Non indicato	B; CD63%	t-test, Wilcoxon	10 <sup>-30</sup> M-10 <sup>-34</sup> M (**)	15C-17C	Suppl.
2001, Sainte-Laudy (33)	13C-14C, acqua non specif.	Non specif.	Non indicato	B; CD63%	Mann-Whitney	Non indicato	Stimolazione 13C	Suppl.
2001, Brown and Ennis (38)	10 <sup>-2</sup> M-10 <sup>-40</sup> M, acqua non specif.	Non specif.	Non indicato	B; CD63%	Wilcoxon	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-6</sup> M, 10 <sup>-14</sup> M, 10 <sup>-18</sup> -10 <sup>-20</sup> M, 10 <sup>-26</sup> M (**)	Non indicato	Suppl.
2003 Lorenz (39)	D0-D34 acqua iniettabile	Non specif.	Non indicato	G; CD63-MFI	Non precisato (SPSS)	10 <sup>-22</sup> M, 10 <sup>-23</sup> M, 10 <sup>-25</sup> , 10 <sup>-26</sup> M (**)	D10-D14	Ext
2004, Belon (34)	2C-20C, acqua non specif.	Dinamizzate a mano	Non indicato	Microscopia ottica (*); B; CD63%	Kruskal-Wallis, Dunnet	10 <sup>-28</sup> M-10 <sup>-36</sup> M (**)	14C,15C, 16C, 17C, 18C	Ext.MC
2005 Guggisberg (40)	10 <sup>-2</sup> M-10 <sup>-40</sup> M acqua distillata	Vortex	Non indicato	B; CD63%	Wilcoxon, Bonferroni (ANOVA) F-test	10 <sup>-2</sup> M e 10 <sup>-22</sup> M (**)	Non indicato	Ext
2006, Sainte-Laudy (35)	2C-18C, acqua deionizzata	Vortex 10sec	Si ma non dettagliato	A; B; E CD63%, CD203c MFI, ratio MFI 203c	Wilcoxon	10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-30</sup> M e 10 <sup>-32</sup> M (**)	2C, 15C, 16C	Ext.
2006, Sainte-Laudy (36)	10 <sup>-2</sup> M-10 <sup>-40</sup> M (2C-20C), acqua non specif.	Vortex 10sec	Non indicato	A; B; C; D CD63%, CD203c MFI	Test U di M.W.	10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-30</sup> M, 10 <sup>-32</sup> M (**)	2C, 15C, 16C	Suppl.
2008, Sainte-Laudy (37)	2C-16C, acqua deionizzata	Vortex 15sec	Si ma non dettagliato	A; CD203c index	Wilcoxon	10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-32</sup> M (**)	2C, 16C	Suppl.
2009, Sainte-Laudy (50)	2C-18C acqua non specif.	Non specif.	Non indicato	A; CD203c MFI	Wilcoxon	10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-32</sup> M, 10 <sup>-34</sup> M (**)	2C, 16C, 17C	Suppl.
2009, Chirumbolo (41)	2C+10C-16C	Dinamizz. verticale	Si, dettagliato	F; CD203c MFI	Shapiro-wilk; Wilcoxon; Friedman	10 <sup>-4</sup> M, 10 <sup>-24</sup> M, 10 <sup>-28</sup> M, 10 <sup>-30</sup> M, 10 <sup>-32</sup> M	2C, 12C, 14C, 15C, 16C	Ext.

Legenda Tabella 1.- A) protocollo 2 colori anti-IgE-FITC, CD203c-PE; B) protocollo 2 colori anti-IgE FITC + CD63-PE; C) protocollo 3 colori CD13-ECD + CD203c-PE + CD63-FITC; D) protocollo 4 colori CD13-ECD+CD14-PC5+CD203c-PE +CD63-FITC; E) protocollo a 3 colori: CD13-ECD+CD14-PC5 + CD203c-PE; F) CD45-APCCy7 + HLADR-PECy7 + CD123-PECy5; G) CD2,CD14,CD16,CD19,HLADR (negative)/CD123 positive; Ext =lavoro in estenso; Suppl. = lavoro in forma di comunicazione breve; MC = studio multicentrico; M.W. = Mann-Whitney. MFI =media dell'intensità di fluorescenza; (\*) esame ottico del numero di cellule che hanno perso cromaticità a causa del rilascio dei granuli basofilici (test di degranulazione); (\*\*) le dosi reali sono diluite nel mezzo di incubazione del 50 o del 25%

**Un accurato reappraisal**

Il problema della ripetibilità dei risultati recensiti dai diversi gruppi di ricerca citati ha coinvolto anche il nostro gruppo di ricerca, impegnato da anni nell'applicazione di modelli cellulari e animali per lo studio dell'efficacia delle alte diluizioni (42) (19;43). Il lavoro che qui viene descritto è stato eseguito con l'obiettivo di aggiungere una parola possibilmente chiara e dirimente dall'indagine in laboratorio, in replicato e in condizioni fortemente standardizzate, alle evidenze già mostrate circa l'efficacia dell'istamina ad alte diluizioni. Quindi si colloca autorevolmente nel dibattito scientifico riguardo l'efficacia biologica delle alte diluizioni di un soluto bioattivo. Nelle nostre procedure sperimentali si è cercato di ottimizzare ogni dettaglio sperimentale del protocollo di ricerca, ritenendo che l'evidenza di certi effetti così fini richiedesse l'applicazione di criteri stringenti di massima precisione metodologica.

**METODI**

In questa sezione si fornisce uno schema dei metodi seguiti, al fine di illustrarne le maggiori caratteristiche di novità, rimandando per i dettagli al lavoro originale (41)

**Isolamento cellulare.**-La prima preoccupazione è stata quella di implementare il saggio analitico in grado di discriminare i basofili dal sangue intero o da un suo derivato arricchito come il buffy coat leucocitario con una identificazione cellulare superiore al 98%. Quasi tutti gli studi, tranne quelli di Lorenz (39) (vedi anche Tabella 1), sono stati eseguiti usando anti-IgE-FITC come marcatore fenotipico dei basofili: tuttavia, oltre al fatto che anche altri leucociti che esprimono un

recettore per le IgE a bassa affinità possono essere riconosciuti da un marcatore anti-IgE, l'uso di questo tracciante induce a interferenze soprattutto quando si usa un anti-IgE monoclonale come attivatore. Il metodo sviluppato dal gruppo dell'Università di Verona (44;45) permette di isolare i basofili in "cattura elettronica" in modo molto netto e preciso e non ha interferenze legate all'attivazione o a contaminazione da altre popolazioni cellulari (Figura 1). Con tale metodo è stato possibile indicare che il marcatore CD203c è molto più specifico per individuare effetti fini legati alle alte diluizioni. Altri hanno notato che c'è una strettissima correlazione tra l'espressione del CD203c e l'attivazione del basofilo (35;46;47).

**Uso di un unico batch di acqua ultrapura e di un controllo in parallelo.**-Un punto strategico per l'ottenimento di risultati statisticamente utilizzabili è stata la scelta dei reattivi più puri e di elevata qualità possibile, allo scopo di ridurre ogni possibile artefatto. Nei lavori citati veniva utilizzata indifferentemente acqua distillata (30;34), acqua deionizzata (35;37), addirittura

acqua del rubinetto (32), acqua per preparazioni iniettabili (39) e persino del brandy (48); nello studio di Chirumbolo e coll è stata usata acqua di Grado I per HPLC fortemente pura e con bassissimo residuo fisso (<0,00001%). L'acqua è un costituente chimico essenziale per lo studio delle alte diluizioni, non è un tipo di eccipiente amorfo e dunque il suo ruolo nella valutazione statistica e sperimentale è prioritario. Un aspetto riguarda la descrizione chiara di un setting di controllo costituito da diluizioni "placebo" fatte con esclusivo solvente ma trattate nello stesso identico modo delle diluizioni seriali di istamina. In effetti questo aspetto rappresenta un punto cruciale per verificare se una diluizione di istamina oltre il limite di Avogadro si comporti in modo statisticamente diverso da una medesima diluizione fatta partendo non da una concentrazione di istamina ma dalla sola acqua usata come solvente. **Titolazione delle diluizioni.**- Nella vasta ricerca sull'effetto che le alte diluizioni acquose di istamina hanno sulla funzione dei basofili umani *in vitro* un punto critico riguarda la molarità delle

concentrazioni di partenza da cui vengono realizzate le diluizioni seriali centesimali. Nei diversi lavori elencati in Tabella 1 l'indicazione in molarità e in diluizioni centesimali non è sempre chiara: in alcuni casi si riporta solo il valore in molarità (29;34), in altri quello in centesimali (49). Nel nostro lavoro sono state usate sempre diluizioni fresche preparate entro 1-2 ore dal test per evitare eventuali problemi legati alla conservazione (50). Nella letteratura del settore sono stati riportati diversi sistemi di saggio con diversi rapporti di concentrazione dell'istamina e non in tutti i lavori viene descritto con precisione questo punto: quando ciò viene fatto l'istamina 2C corrisponde quasi sempre ad una soluzione  $2,5 \times 10^{-5}$  M invece di una più lineare  $10^{-4}$  M; anche se questo dato potrebbe non risultare significativo ai fini di una verifica del funzionamento di un'alta diluizione, permette di tracciare con maggiore precisione e standardizzazione l'impiego delle diluizioni e dovrebbe dirimere il dato per cui alcuni lavori riportano efficacia su diluizioni diverse (29;38).

**Scelta e dosaggio dell'attivatore.**- La scelta dell'attivatore dei basofili più corretto è stata agevolata da due fattori: l'uso di un agonista il più vicino possibile alla fisiologia naturale dei meccanismi di attivazione dei basofili e la scelta di un agonista già usato nei lavori di ricerca indicati. Il miglior candidato è stato quindi un anticorpo monoclonale anti-IgE che simulando il cross-linking delle IgE di superficie del basofilo, come fanno gli allergeni immunoreattivi, era in grado di attivare questo leucocita. Il punto critico è stata la scelta del dosaggio ottimale. Diversi lavori hanno studiato il rapporto tra tipologia, dosaggio e scelta dell'anticorpo anti-IgE e l'attivazione cellulare (32;51;52) e anche il lavoro di Belon identifica varie concentra-

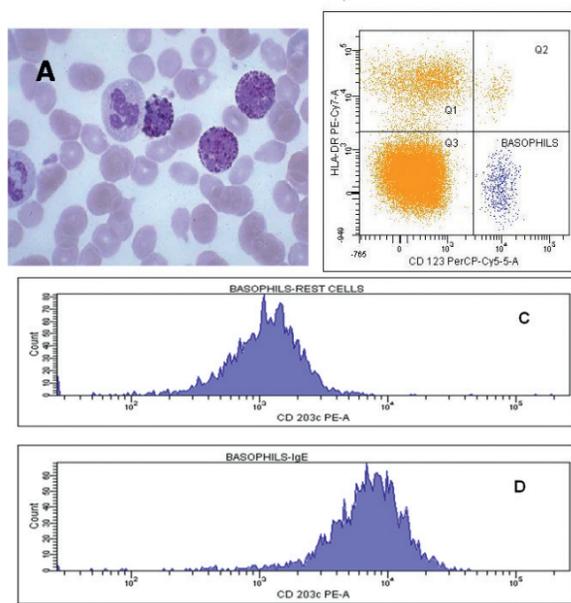
zioni per lo studio multicentrico sulla degranulazione (34) tuttavia, la dose più usata è intorno al valore di 1 µg/ml. Questa è una dose relativamente bassa di attivatore (45) ma è quella usata nel nostro lavoro al fine di creare delle condizioni di attivazione delicata e quindi probabilmente più suscettibile di regolazione da parte di energie fisico-chimiche presumibilmente molto fini quali quelle delle alte diluizioni/dinamizzazioni.

**Succussione.**- L'argomento succussione è stato un punto cruciale come lo è stato quello delle diluizioni centesimali. Questi due punti della metodologia sperimentale sono in qualche modo gli unici che collegano l'argomento delle proprietà farmacodinamiche delle alte diluizioni all'omeopatia. Nessun gruppo di ricerca ha usato metodologie di succussione usate nella farmacopea ufficiale. La metodologia usata dai laboratori coinvolti è sempre stata quella del vortex (Tabella 1) (34).

Anche il gruppo veronese di Bellavite in una prima fase sperimentale ha usato un metodo di succussione attraverso un vortex, verificando sostanzialmente l'esistenza dello stesso effetto ma i dati che sono stati ottenuti con migliore significatività statistica sono risultati trattando le diluizioni con un macchinario di succussione omologato che applica alle provette di laboratorio 150 scosse verticali (20x7,5 sec) della escursione di circa  $7 \pm 2$  mm (41)(Systema S.p.A., Milano).

**RISULTATI**

La Tabella 2 sottostante illustra i risultati che evidenziano come l'istamina diluita oltre il numero di Avogadro inibisce la funzione dei basofili *in vitro* (41). Si riportano le medie, gli errori standard medi (S.E.M.) e i valori fiduciali di significatività (p) delle percentuali di inibizione sull'attivazione dei



**A:** Immagine microscopica di striscio periferico con basofili umani; **B:** separazione di basofili al citofluorimetro; **C e D:** cambiamento in fluorescenza del marcatore CD203c in seguito all'attivazione con anti-IgE; **C = a** riposo; **D = con** attivatore. In ascissa le intensità di fluorescenza.

Tabella 2.- Percentuale di inibizione del marcatore CD203c nelle diluizioni dinamizzate di istamina (A) e nelle diluizioni dinamizzate di solo solvente (B)

Diluizioni/ /dinamizz.	Istamina diluita e dinamizzata				Acqua diluita e dinamizzata		
	Concentraz. teorica di istamina (mol/L)	Media	Errore Standard (S.E.M.)	P rispetto al controllo (placebo)	Media	Errore Standard (S.E.M.)	P rispetto al controllo (placebo)
10C	10 <sup>-20</sup>	9,0	5,3	n.s.	3,0	4,6	n.s.
11C	10 <sup>-22</sup>	2,8	7,6	n.s.	3,7	6,0	n.s.
12C	10 <sup>-24</sup>	11,7	9,2	*	5,6	3,6	n.s.
13C	10 <sup>-26</sup>	13,9	6,1	n.s.	6,1	4,9	n.s.
14C	10 <sup>-28</sup>	23,7	6,7	**	0,8	4,7	n.s.
15C	10 <sup>-30</sup>	12,4	10,3	*	2,0	4,6	n.s.
16C	10 <sup>-32</sup>	18,0	7,2	**	0,6	7,0	n.s.

\*: dato statisticamente significativo (probabilità di errore <5%), \*\*: dato altamente significativo (probabilità di errore <1%). n.s.= differenza non statisticamente significativa

basofili umani da anti-IgE operata da diluizioni centesimali successe di istamina (5 esperimenti separati in triplicato, per un totale di 15 test sperimentali su ogni diluizione). La batteria di diluizioni/dinamizzazioni usate comprende una serie di diluizioni di istamina da  $10^{-20}$  M a  $10^{-32}$  M che nel sistema di saggio corrispondono esattamente al range centesimale da 10C a 16C, in modo da comprendere sia il "passaggio" della costante di Avogadro, sia l'intervallo più comunemente riportato come efficace da precedenti studi che hanno usato lo stesso modello sperimentale. Si osserva una inibizione compresa tra il 10 ed il 25% trattando i basofili con istamina 12C, 14C, 15C e 16C con un tipico andamento sinusoidale in cui alcune diluizioni anche intermedie non presentano efficacia significativa (10C, 11C e 13C). Si tratta di dati che confermano l'efficacia di diluizioni di istamina nel range 14C-16C, come altrove indicato (32).

Guardando a questi risultati il primo sospetto potrebbe essere quello di un artefatto, dovuto ad esempio alla diversa collocazione e/o temperatura delle provette nel bagno di incubazione, a eventuale materiale disciolto dalle provette stesse, o allo stesso processo di succussione con dissoluzione di ossigeno e azoto nella soluzione dinamizzata. Per dirimere questo legittimo dubbio sulla specificità del fenomeno una batteria di altri 5 esperimenti indipendenti in triplicato (15 replicati) fatti allo stesso identico modo ma usando solo acqua invece che istamina 2C come concentrazione di partenza (cioè, per dirla in termini omeopatici, acqua pura come tintura madre) non ha dato alcun effetto inibitorio (Tabella 2). Questo dato indica l'inefficacia della semplice succussione meccanica sull'acqua, in assenza di una biomolecola informatrice.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati qui descritti confermano e rafforzano i numerosi risultati altrove pubblicati sull'azione inibitoria di alte diluizioni acquose di istamina. Il fatto che diversi studi in diversi laboratori, pur essendo condotti con campioni, metodi, operatori e condizioni diverse, siano concordi nell'evidenziare un effetto farmacodinamico delle alte diluizioni di un composto bioattivo come l'istamina contribuisce a sostenere l'idea che il principio metodologico stesso delle diluizioni omeopatiche è oltre che plausibile scientificamente percorribile. Naturalmente, ciò non prova direttamente l'efficacia clinica dell'omeopatia, per la quale servono evidenze di tipo clinico.

La plausibilità che una diluizione in acqua di un composto molecolare che supera le colonne d'Ercole del numero di Avogadro abbia caratteristiche bioinformazionali diventa legittima e razionalmente considerabile se si abbandona l'idea che l'informazione chimica biomolecolare sia l'unico tipo di modalità con cui i fenomeni biologici si verificano. Questa osservazione lancia la sfida per un approfondimento nello studio della struttura e delle proprietà dell'acqua liquida (53), su cosa avvenga quando un sistema chimico si avvicina al numero di Avogadro e se nelle condizioni limite predominino forze fisiche più che chimiche (54), per cui sarebbe necessario approfondire gli sviluppi teorici della fisica della materia condensata e sviluppare nuovi modelli esplicativi sulla funzione biologica nei quali l'acqua non è più uno fondale passivo (55).

In letteratura esistono numerosi lavori che descrivono il comportamento di soluti biologicamente attivi a dosi prossime a decine o unità di attomoli (da  $10^{-17}$  M a  $10^{-18}$  M) (56;57) e di evidenze sperimentali anche a dosi inferiori, cioè nell'ordine delle zeptomoli ( $10^{-20}$  M) (58;59). Il turn

over del ferro è ad esempio controllato da fini meccanismi di regolazione allo scopo di mantenere la sua concentrazione libera nei fluidi biologici non superiore alle  $10^{-18}$  moli/L (60;61). Se volessimo descrivere questi livelli di titolazione con la classica terminologia omeopatica, posto che la prima diluizione centesimale venga operata su una tintura madre contenente 1 mole di principio attivo, alla 9C o 10C potremmo descrivere l'effetto biologico come un effetto farmacologico da basse dosi di soluto attivo. Ciò che resta inspiegabile è come una densità così bassa di molecole possa raggiungere un recettore cellulare nei tempi rapidi descritti dalla classica farmacodinamica (57): questo è un tema ancora aperto. Alcuni autori indicano che nella cellula queste condizioni così fini sono l'usualità (62) ma non tutti sono d'accordo (63); è verosimile, piuttosto, che un ruolo chiave possa essere giocato dall'acqua, eventualmente in associazione con ioni e gas comunemente in essa disciolti. La partecipazione di nanobolle di gas al fenomeno della ritenzione informativa dell'acqua è sostenuta da diversi autori (64) anche perché queste nanobolle sono state realmente identificate e secondo alcune ipotesi sarebbero stabilizzate da ioni presenti in tracce che contribuirebbero alla costruzione di un'architettura frattale di nanoclusters (65). Queste nanobolle, a causa delle proprietà magnetiche ed idrofobiche dell'ossigeno, sono capaci di veicolare nell'acqua un campo elettromagnetico o di radiofrequenza (66), proprietà che sembra non verificarsi in condizioni di degassamento (67). L'interfaccia gas-acqua, inoltre, giocherebbe un ruolo chiave perché si formerebbero delle strutture simili ai reticoli cristallini del ghiaccio intorno alle nanobolle creando dei "gusci" ordinati che indurrebbero la formazione di strutture sopramolecolari molto ampie, grandi anche parecchi micrometri (65). È stato suggerito che le piccole molecole stabilizzerebbero queste strutture e che quindi

l'istamina potrebbe agire come centro di nucleazione per la formazione di cluster indotti dalle nanobolle. Questi modelli cercano di spiegare i diversi comportamenti delle alte diluizioni agli esami spettroscopici ma non permettono sempre di far luce sulle proprietà biologiche di un'alta diluizione. Non è tuttavia improbabile che in un prossimo futuro la scienza dei materiali possa fornire qualche ragguaglio sul fenomeno, in base al modello ipotetico secondo cui architetture diverse di cluster in acqua potrebbero disporre di una diversa informatività chimica (68). In realtà, le teorie circa il modo con cui l'acqua di una diluizione seriale "conserva" le proprietà informazionali di un soluto quando quest'ultimo non è più titolabile sono numerose e non sempre mettono d'accordo tra loro i diversi ricercatori (12;64;69-78). Un ruolo chiave sembra essere esercitato dal processo di succussione cioè dall'applicazione di una agitazione meccanica forte alle diverse diluizioni seriali operate secondo la farmacopea ufficiale omeopatica (79). Esistono dati biofisici in grado di confermare, con tecniche spettroscopiche o di risonanza magnetica, l'assoluta diversità di un'alta diluizione rispetto allo stesso solvente mai trattato (11;65). Non si tratta di una diversità legata alla presenza di eventuali impurezze poiché ad ogni modo l'acqua pura al 100% è una situazione ideale che non può essere creata in laboratorio (3), per cui, anche se non si può a rigore escludere che le alte diluizioni non siano influenzate da questo dato e dalla relazione che l'acqua ha inevitabilmente con l'aria e con il contenitore (64;80-83), le proprietà farmacodinamiche di un'alta diluizione rappresentano un aspetto del comportamento dell'acqua. La comprensione, perciò, del fenomeno delle proprietà di "memoria" dell'acqua può essere raggiunta su due fronti, non obbligatoriamente indipendenti: il primo è la ricerca biofisica ed il secondo è la ricerca biologica di base. Lo studio del no-

stro gruppo (41) porta un consistente contributo a quest'ultimo settore della ricerca biomedica. Altri esperimenti, magari eseguiti in assenza di succussione, potrebbero fornire ragguagli più precisi su queste ipotesi speculative.

È curioso, ed allo stesso tempo straordinario, il fatto che il modello "istamina" stia diventando per la ricerca di base in omeopatia quasi una "pietra angolare" su cui si potrà poi costruire un più articolato edificio che comprenda anche gli effetti di altri principi attivi. L'istamina, molecola così semplice ma allo stesso tempo interessantissima per i suoi molteplici interventi in fisiologia e patologia, è fra l'altro il mediatore capostipite dell'infiammazione acuta, che a sua volta è il processo-chiave nella regolazione della salute e nel determinismo delle patologie; non si dimentichi che l'istamina è anche un neuro-trasmittitore. Tale sostanza, diluita secondo le procedure omeopatiche, ha dato prova di un comportamento spettroscopico diverso dalle semplici diluizioni in acqua (65), di funzionare sul modello dei basofili *in vitro* (dati riportati in questa rassegna) e pure su modelli animali (84-87); pertanto attorno a questa molecola si è andata costituendo, nel giro di due decenni, una molteplicità di evidenze che non possono essere ignorate da chiunque voglia pronunciarsi sulle basi scientifiche dell'omeopatia con cognizione di causa.

La spiegazione dei fenomeni naturali non è una condizione *sine qua non* un medico possa esercitare la propria autorevole missione per la tutela della salute dell'uomo: l'efficacia del trattamento è il punto fondamentale. Tuttavia, per le scienze omeopatiche, nel contesto della medicina moderna, la "memoria dell'acqua" è rimasta un tabù dal quale per lungo tempo non si è riusciti a sfuggire. L'evidenza scientifica che l'acqua, il liquido più diffuso nell'Universo, conduce o amplifica un'informazione

biologica può contare su numerose prove e se anche si è cominciato a formulare qualche modello esplicativo la comprensione definitiva di queste proprietà e del suo ruolo negli organismi è di là da venire e si tratta di un compito che la scienza non può disattendere.

## NOTE E RINGRAZIAMENTI

Lavoro eseguito con fondi del Ministero per l'Istruzione, l'Università e la Ricerca (ex 60% MURST) e grazie ad un accordo di collaborazione scientifica tra Università di Verona e Laboratoires Boiron s.r.l. Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse nella ricerca.

### BIBLIOGRAFIA

- SCHIFF M 1995. The Memory of Water. *Thorsons*, ed San Francisco, CA:12.
- CHAPLIN M 2007. The memory of water: an overview. *Homeopathy* 96:143-150.
- CHATTOPADHYAY S 2003. Biomathematical modeling for diluted drugs. *Med Hypoth* 61:56-59.
- BASTIDE M and LAGACHE A 1997. A communication process: a new paradigm applied to high-dilution effects on the living body. *Altern Ther Health Med* 3:35-39.
- REY L 2003. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. *Physica A* 323:67-74.
- ELIA V, ELIA L, MARCHESE M, MONTANINO M, NAPOLI E, NICCOLI M, NONATELLI L, and SAVARESE F 2007. Interaction of extremely diluted solutions with aqueous solutions of hydrochloric acid and sodium hydroxide. A calorimetric study at 298 K. *J Mol Liq* 130:15-20.
- DEL GIUDICE E, ELIA V, NAPOLI E, and TEDESCHI A 2007. Il ruolo dell'acqua nella materia vivente. *La Medicina Biologica* 4:39.
- BETTI L, BORGHINI F, and NANI D 2003. Plant models for fundamental research in homeopathy. *Homeopathy* 92:129-130.
- BETTI L, TREBBI G, NANI D, MAJEWSKI V, SCHERR C, JAGER T, and BAUMGARTNER S 2008. Models with plants, microorganisms and viruses for basic research in homeopathy. in *Signals and Images* L.V. Bonamin ed., 2008.
- NANI D, BRIZZI M, LAZZARATO L, and BETTI L 2007. The role of variability in evaluating high dilution effects: considerations based on plant model experiments. *Forsch. Komplementarmed* 14:305.
- ELIA, V. AND NICCOLI, M. 1999. Thermodynamics of extremely diluted aqueous solutions. *Ann N.Y. Acad Sci* 879:241-248.
- ELIA, V., NAPOLI, E., and GERMANO, R. 2007. The 'Memory of Water': an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. *Homeopathy* 96:163-169.
- KRALY JR, JONES MR, GOMEZ DG, DICKERSON JA, HARWOOD MM, and ET AL 2006. Rapid and reproducible two-dimensional capillary electrophoresis analysis of Barrett's esophagus tissues. *Anal Chem* 78:5977-5986.
- SUN X, GAO N, and JIN W 2006. Monitoring yocytomole alkaline phosphatase by capillary electrophoresis with on-capillary catalysis-electrochemical detection. *Analytica Chim Acta* 571:30-33.

15. DAS BEDAMATI and GUPTA-BHAYA P 1995. Statistical interpretation of 10-24 moles and less. *Am J Physics* 63:1025-1028.
16. PREPARATA G 1995. QED Coherence in matter. *World Scientific* London, 1995.
17. ARANI R, BONO I, DEL GIUDICE E, and PREPARATA G 1995. QED Coherence and the thermodynamics of water. *Int J Mod Phys* 89:1813-1841.
18. CHIRUMBOLO S, BRIZZI M, and BELLAVITE P 2008. Ricerca di base in omeopatia-Gli studi in vitro sui neurofilii e basofili umani. *Il Medico Omeopata* Anno XIII:20-26.
19. BELLAVITE P, CONFORTI A, PONTAROLLO F, and ORTOLANI R 2006. Immunology and homeopathy 2 Cells of the immune system and inflammation. *Evid Based Complement Altern Med* 3:13-24.
20. BELLAVITE P, ORTOLANI R, and CONFORTI A. 2006. Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. *Evid. Based. Complement Alternat. Med* 3:171-186.
21. BRIZZI M, LAZZARATO L, NANI D, BORGHINI F, PERUZZI M, and BETTI L 2005. A biostatistical insight into the As2O3 high dilution effects on the rate and variability of wheat seedling growth. *Forsch. Komplementarmed* 12:277-283.
22. WITT, C. M., BLUTH, M., ALBRECHT, H., WEISSHUHN, T. E., BAUMGARTNER, S., and WILICH, S. N. 2007. The in vitro evidence for an effect of high homeopathic potencies—a systematic review of the literature. *Complement Ther. Med* 15:128-138.
23. BELLAVITE P, PITARI, G., and ITALIANO, M. 2006. Homeopathy and placebo. *Homeopathy* 95:51.
24. MIESCHER, S. M. and VOGEL, M. 2002. Molecular aspects of allergy. *Mol Aspects Med* 23:413-462.
25. AZUMA, Y., SHINOHARA, M., WANG, P. L., HIDAKA, A., and OHURA, K. 2001. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF $\alpha$  and IL-12 by macrophages via H2-receptors. *Int Immunopharmacol* 1:1867-1875.
26. CHERRIALULTY Y, GUILLEZ A, SAINTE LAUDY J, and BELON P 1989. Etude mathématique et statistique des effets de dilutions successives de chlorhydrate d'histamine sur la réactivité des basophiles humains. *Bio Sciences* 7:63-72.
27. SAINTE-LAUDY J and BELON P 1993. Inhibition of human basophil activation by high dilution of histamine. *Agents Action* 38:C245-C247.
28. SAINTE LAUDY J, SAMUCY JL, and BELON P 1991. Biological activity of ultra low doses I. Effect of ultra low doses of histamine on human basophil degranulation triggered by D. pteronissinus extract. in *Ultra Low Doses Doutremepuich* C ed:127-138.
29. SAINTE-LAUDY J, and BELON, P. 1996. Analysis of immunosuppressive activity of serial dilutions of histamine on human basophil activation by flow cytometry. *Inflamm Res* 45 Suppl 1:S33-S34.
30. SAINTE-LAUDY, J. and BELON, P. 1997. Application of flow cytometry to the analysis of the immunosuppressive effect of histamine dilutions on human basophil activation: effect of cimetidine. *Inflamm Res* 46 Suppl 1:S27-S28.
31. BELON, P., CUMPS, J., ENNIS, M., MANNAIONI, P. F., SAINTE-LAUDY, J., ROBERFROID, M., and WIEGANT, F. A. 1999. Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a European multicentre trial. *Inflamm Res* 48 Suppl 1:S17-S18.
32. SAINTE-LAUDY J 2000. Modulation of allergen and anti-IgE induced human basophil activation by serial histamine dilutions. *Inflamm Res* 49 (suppl. 1):S5-S6.
33. SAINTE-LAUDY J 2001. Stimulatory effect of high dilutions of histamine on activation of human basophils induced by anti-IgE. *Inflamm Res* 50 (suppl.2):S63-S64.
34. BELON, P., CUMPS, J., ENNIS, M., MANNAIONI, P. F., ROBERFROID, M., SAINTE-LAUDY, J., and WIEGANT, F. A. 2004. Histamine dilutions modulate basophil activation. *Inflamm Res* 53:181-188.
35. SAINTE-LAUDY, J. and BELON, P. 2006. Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions. A novel basophil specific marker: CD 203c. *Homeopathy* 95:3-8.
36. SAINTE-LAUDY, J. and BELON, P. 2006. Use of four different flow cytometric protocols for the analysis of human basophil activation. Application to the study of the biological activity of high dilutions of histamine. *Inflamm Res* 55 Suppl 1:S23-S24.
37. SAINTE-LAUDY J, BOUJENAINI N, and BELON P 2008. Confirmation of biological effects of high dilutions. Effects of submolecular concentrations of histamine and 1-, 3- and 4-methyl-histamines on human basophil activation *Inflamm Res* 57:S01-S02.
38. BROWN, V. and ENNIS, M. 2001. Flow-cytometric analysis of basophil activation: inhibition by histamine at conventional and homeopathic concentrations. *Inflamm. Res.* 50 Suppl 2:S47-S48.
39. LORENZ, I., SCHNEIDER, E. M., STOLZ, P., BRACK, A., and STRUBE, J. 2003. Sensitive flow cytometric method to test basophil activation influenced by homeopathic histamine dilutions. *Forsch. Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 10:316-324.
40. GUGGISBERG, A. G., BAUMGARTNER, S. M., TSCHOPP, C. M., and HEUSSER, P. 2005. Replication study concerning the effects of homeopathic dilutions of histamine on human basophil degranulation in vitro. *Complement Ther. Med* 13:91-100.
41. CHIRUMBOLO S, BRIZZI M, ORTOLANI R, VELLA A, and BELLAVITE P. 2009. Inhibition of CD203c membrane up-regulation in human basophils by high dilutions of histamine: a controlled replication study. *Inflamm Res* DOI: 10.1007/s00011-009-0044-4.
42. CHIRUMBOLO S, SIGNORINI A, BIANCHI I, LIPPI G, and BELLAVITE P 1993. Effects of homeopathic preparations of organic acids and minerals on the oxidative metabolism of human neutrophils. *Br Hom J* 82:237-244.
43. BELLAVITE, P., ORTOLANI, R., and CONFORTI, A. 2006. Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. *Evid. Based. Complement Alternat. Med* 3:171-186.
44. CHIRUMBOLO S, ORTOLANI R, VELLA A, TRIDENTE G, and BELLAVITE P 2008. A six-color polychromatic flow cytometry to evaluate human basophil activation. *Cytometry* 73A:91.
45. CHIRUMBOLO S, VELLA, A., ORTOLANI, R., DE, G. M., SOLERO, P., TRIDENTE, G., and BELLAVITE, P. 2008. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy* 6:12.
46. BUHRING, H. J., SEIFFERT, M., GIESERT, C., MARXER, A., KANZ, L., VALENT, P., and SANO, K. 2001. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood* 97:3303-3305.
47. BUHRING, H. J., STREBLE, A., and VALENT, P. 2004. The basophil-specific coenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 133:317-329.
48. LORENZ, I., SCHNEIDER, E. M., STOLZ, P., BRACK, A., and STRUBE, J. 2003. Influence of the diluent on the effect of highly diluted histamine on basophil activation. *Homeopathy*. 92:11-18.
49. SAINTE-LAUDY, J., BOUJENAINI, N., and BELON, P. 2008. Confirmation of biological effects of high dilutions. Effects of submolecular concentrations of histamine and 1, 3- and 4-methylhistamines on human basophil activation. *Inflamm Res* 57 Suppl 1:S27-S28.
50. SAINTE-LAUDY, J., BOUDJEDAINI, N., and BELON, P. 2009. Differential effect of storage on molecular and ultra-molecular dilutions of histamine. *Inflamm Res* 58 Suppl 1:30-31.
51. SAINTE-LAUDY, J., SABBAB, A., VALLON, C., and GUERIN, J. C. 1998. Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm. Res.* 47:401-408.
52. MARONE, G., KAGEY-SOBOTKA, A., and LICHTENSTEIN, L. M. 1981. IgE-mediated histamine release from human basophils: differences between antigen E- and anti-IgE-induced secretion. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 65:339-348.
53. BEGLEY S 2006. Science journal: the structure of water is 'n't certain after all. *The Wall Street J* March 10, 2006.
54. EGOROV, V. V. 2003. [The analogy of biological effects of ultra low chemical and physical doses]. *Radiat. Biol Radioecol.* 43:261-264.
55. BALL P 2008. Water as an active constituent in cell biology *Chem Rev* 108:108.
56. GUREVICH K 2001. Low doses of biologically active substances: effects, possible mechanisms and features. *Cell Biology International* 25:475-484.
57. GUREVICH KG, AGUTTER PS, and WHEATLEY DN 2003. Stochastic description of the ligand-receptor interaction of biologically active substances at extremely low doses. *Cellular Signalling* 15:447-453.
58. CSABA G, KOVACS P, TOTHEALUSI L, and PALLINGER E 2006. Effects of extremely low concentrations of hormones on the insulin binding of Tetrahymena. *Cell Biol International* 30:957-962.
59. CSABA G, KOVACS P, and PALLINGER E 2007. How does the unicellular Tetrahymena utilize the hormones that it produces? Paying a visit to the realm of atto- and zeptomolar concentrations. *Cell Tissue Res* 327:199-203.
60. BULLEN JJ, ROGERS HJ, SPALDING PB, and WARD CG 2005. Iron nd infection: the heart of the matter. *FEMS Immunology and Med Microbiol* 43:325-330.
61. VALENTI P, PACIFICI E, PIETROPOLI M, and PEA-SANO R 2008. La lattoferrina per os, un'importante alternativa priva di effetti indesiderati, nella prevenzione e trattamento dell'ipoferrémia ed anemia da carenza di ferro in gravidanza. *Riv It Ost Gin* 17:783-790.
62. FIELDS DS 1999. The yoctomole limit: playground of cells. *Trends Biochem Sci* 24:129.
63. CASTAGNOLA M 1999. Reply to Fields. *Trends Biochem Sci* 24:129.
64. VOEIKOV VL 2007. The possible role of active oxygen in the memory of water. *Homeopathy* 96:196-202.
65. DEMANGEAT JL 2009. NMR water proton relaxation in unheated and heated ultrahigh aqueous dilutions of histamine: Evidence for an air-dependent supramolecular organization of water. *J Mol Liq* 144:32-39.
66. OTSUKA I and OZEKI S 2006. Does magnetic treatment of water change its property? *J Phys Chem B* 110:1509-1512.
67. KATSIR Y, MILLER L, AHARONOV Y, and JACOB EB 2007. The effect of rf-irradiation on electrochemical deposition and its stabilization by nanoparticles doping. *J Electrochem Soc* 154:D249-D259.
68. ROY R, TILLER WA, BELL I, and HOOVER MR 2005. The structure of liquid waters: novel insights from material research; potential relevance to homeopathy. *Mat Res Innovat* 9:98-103.
69. WIEGANT, F. A. 1994. Memory of water revisited. *Nature* 370:322.
70. COLIC M and MORSE D 1999. The elusive mechanism of the magnetic memory of water. *Colloids and Surfaces A* 154:167-174.
71. TSCHULAKOW, A. V., YAN, Y., and KLIMEK, W. 2005. A new approach to the memory of water. *Homeopathy* 94:241-247.
72. MILGROM, L. R. 2006. Is homeopathy possible? *J R Soc Health* 126:211-218.
73. CHAPLIN, M. F. 2007. The Memory of Water: an overview. *Homeopathy* 96:143-150.
74. POITEVIN, B. 2008. The continuing mystery of the Memory of Water. *Homeopathy* 97:39-41.
75. VYBIRAL, B. and VORACEK, P. 2007. Long term structural effects in water: autohixotropy of water and its hysteresis. *Homeopathy* 96:183-188.
76. ANICK DJ and IVES JA 2007. The silica hypothesis for homeopathy: physical chemistry. *Homeopathy* 96:203-209.
77. ANICK, D. J. 2007. The octave potencies convention: a mathematical model of dilution and succession. *Homeopathy* 96:202-208.
78. MILGROM LR 2007. Conspicuous by its absence: the memory of water, macro-entanglement and the possibility of homeopathy. *Homeopathy* 96:209-219.
79. TORRES 2002. On the physical basis of succession. *Homeopathy* 91:221-224.
80. VYSOTSKIY V, SMIRNOV I, and KORNILOVA A 2005. Introduction to the biophysics of activated water. *Universal Publishers* Boca Raton (FL).
81. RAO, M. L., ROY, R., BELL, I. R., and HOOVER, R. 2007. The defining role of structure (including epitaxy) in the plausibility of homeopathy. *Homeopathy* 96:175-182.
82. ANICK, D. J. and IVES, J. A. 2007. The silica hypothesis for homeopathy: physical chemistry. *Homeopathy* 96:189-195.
83. WITT, C. M., LUDTKE, R., WEISSHUHN, T. E., QUINT, P., and WILICH, S. N. 2006. The role of trace elements in homeopathic preparations and the influence of container material, storage duration, and potentisation. *Forsch. Komplementmed.* 13:15-21.
84. HADJI L, AMOUX B, and BENVENISTE J 1991. Effect of dilute histamine on coronary flow of isolated guinea-pig heart. *FASEB J* 5:A1583.
85. CONFORTI A, SIGNORINI A, and BELLAVITE P 1993. Effects of high dilutions of histamin and other natural compounds on acute inflammation in rats. in *Omeomed* 92 Bor-noroni ed, 1993:163-169.
86. BOUSTA, D., SOULIMANI, R., JARMOUINI, I., BELON, P., FALLA, J., FROMENT, N., and YOUNOS, C. 2001. Neurotropic, immunologic and gastric effects of low doses of Atropa belladonna L., Gelsemium sempervirens L. and Pounon histamine in stressed mice. *J Ethnopharmacol.* 74:205-215.
87. RUIZ-VEGA G, POITEVIN B, and ORDAZ-PEREZ L 2005. Histamine at high dilution reduces spectral density in delta band in sleeping rats. *Homeopathy* 94:86-91.