

## **Исследование ингибирующей эффективности когерентной воды (система “Диполь”)**

Краснобрыжев В.Г.

E-mail: vkentron@gmail.com

Киев, тел. +38 044 4059675, +38 097 5609593.

### **1. Назначение воды**

Ингибирование репродукции ВИЧ, вирусов везикулярного стоматита и герпеса.

### **2. Состав Системы и принцип действия когерентной воды**

В основу Системы положены достижения квантовой физики последнего десятилетия и в частности трансляционные эффекты физики запутанных квантовых состояний (entangled states).

В Систему входят: блок трансляции спиновых состояний, чип-транслятор, чип-индуктор, емкость с водой. Трансляционный блок осуществляет передачу через чип-транслятор, на расстояние, спинового когерентного состояния воды. Чип-индуктор, закрепленный на емкости с водой (1,5-10 литров), принимает это состояние и переводит воду в емкости в такое же когерентное состояние. При этом частота когерентного состояния выбирается таким образом, чтобы она соответствовала резонансной частоте воды.

После приема пациентом такой воды, вода в его организме также переходит в спиновое когерентное состояние (эффект синхронизации). Это состояние удерживается в течение 2-3 минут, а затем начинается медленная спиновая декогеризация.

На графике рис. 1 приведена дисперсия разупорядочения спиновых структур воды находящейся в исходном, когерентном и декогерентном состояниях, при одновременном воздействии на нее внешнего магнитного поля и низкочастотного (до 8,2 Гц) звука. Измерения проводились с помощью аппаратно-программного комплекса "Оберон".

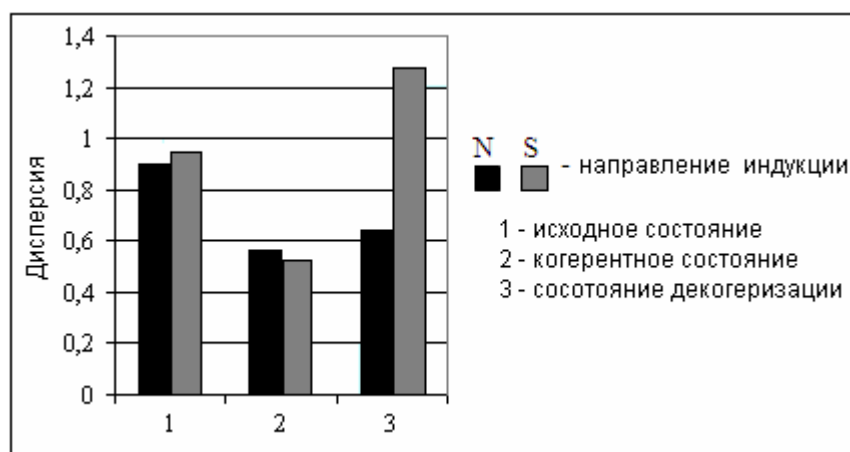


Рис. 1.

Как видно из приведенных на рис. 1 графических соотношений, наибольшая дисперсия разупорядочения спиновых структур воды соответствует инактивированному и декогерентному состояниям, что объясняется конверсией спиновых состояний из синглетных в триплетные с преобладанием (до 97%) триплетных.

В основе процессов развития вирусных инфекции в клеточных структурах организма лежат биохимические реакции, скорость которых регулируется не только ферментами, но и спиновыми состояниями реагентов.

Из спиновой химии известно, если в химической реакции сталкивающиеся молекулы имеют антипараллельные спины (синглетное состояние), образование химической связи происходит. Если взаимодействующие молекулы имеют параллельные спины (триплетное состояние), то молекула может образоваться только в триплетном, возбужденном состоянии. Поскольку такие состояния обычно лежат высоко по энергии, в подавляющем большинстве случаев химические реакции в триплетной паре невозможны.

Известно также, что химическими реакциями управляют два фундаментальных фактора - энергия и спин. При этом запрет химических реакций по спину непреодолим. Согласно правилу Вигнера, статистический вес встреч двух молекул в синглетном состоянии равен  $1/4$ , а статистический вес встреч в триплетном состоянии равен  $3/4$ . В подавляющем большинстве случаев основное состояние продуктов химической реакции является синглетным, и поэтому следует ожидать, что только четверть встреч реагирующих молекул может дать продукт реакции.

Теперь вернемся к спиновой декогеризации воды в организме пациента. Такая декогеризация существенным образом влияет на процессы спинового обмена реагирующих в биохимических реакциях молекул. Это влияние возникает по двум причинам. Во-первых, связанная с декогеризацией переориентация спина одной из молекул за время столкновения многократно меняется, следовательно, меняется в пространстве и направление оси, вокруг которой прецессирует спин второй молекулы. Во-вторых, выполнение z-проекции суммарного спина столкнувшихся партнеров не является уже интегралом движения, и поэтому спиновое состояние

партнеров при столкновении может изменяться произвольным образом. В результате декогеризации синглетные пары рекомбинируют в триплетные, а эффективность химической реакции может снижаться в 10-100 раз. Это блестяще подтвердилось в лабораторных исследованиях, результаты которых приведены ниже.

### **3. Цитологическое и цитогенетическое изучение когерентной воды**

Институтом эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины в рамках договора, заключенного Институтом с Научно-производственным центром «Природа», для проведения исследований была передана когерентная вода создаваемая в НПЦ «Природа» с помощью Системы «Диполь».

#### **Материалы и методы**

Препарат – представлен в виде когерентной воды. Культура клеток - использовалась первичная человеческая эмбриональная ткань (ЧЭТ).

Культуру клеток получали из 8-9 недельных зародышей человека, полученных после свежего стерильного соскоба, по общепринятой методике трипсинизации измельченных кусочков. Клетки выращивали в питательной среде RPMI-1640+10% эмбриональной сыворотки теленка + антибиотики.

Для цитологических исследований клетки выращивали на покровных стеклах в обычных бактериологических пробирках.

Цитологические препараты готовили по методике Г.И. Роскина и Л.Б. Левинсона (Микроскопическая техника, 1957). Клетки обрабатывали фиксатором по Шабашу, обезвоживали и окрашивали гематоксилин-эозином (гематоксилин готовили по методу Бемера). Просмотр препаратов осуществляли в микроскопе МБИ-15 - окуляр x10, объектив X90.

Изучались следующие показатели: 1 - пролиферативная активность, индекс пролиферации выражали в промилле (‰); 2 - наличие патологических митозов по методу И.А.Алова (1965). Цитогенетические препараты готовили по методике, изложенной в издании ВОЗ "Методы анализа хромосомных aberrаций у человека" под редакцией К.Бактона и Г.Эванса, 1975. Просмотр препаратов проводили в микроскопе МБИ-15 - окуляр x10, объектив X90.

При изучении метафаз подсчитывалось число хромосом и aberrации в них. Для изучения влияния когерентной воды на цитологические и цитогенетические показатели клетки ЧЭТ в фазе логарифмического роста обрабатывали когерентной водой и через 24 часа готовили препараты. Контролем служили клетки, не подвергавшиеся никаким воздействиям.

#### **Результаты и их обсуждение**

Цитологическое изучение препаратов, полученных на ЧЭТ, обработанных когерентной водой, представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Влияние когерентной воды на митотический режим клеток ЧЭТ.

Воздействие	Mi (в ‰)	Нормальные митозы, в	
		‰	Аномальные митозы, в ‰
Когерентная вода	21,0	91,4	8,6
Контроль клеток	29,0	93,2	6,8

Как видно из представленной таблицы 1, когерентная вода не оказывала существенного влияния на митотический режим клеток ЧЭТ по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию. В таблице 2 представлены результаты цитогенетического изучения клеток ЧЭТ, обработанных когерентной водой.

Таблица 2 - Цитогенетические показатели клеток ЧЭТ, обработанных когерентной водой.

Воздействие	Клетки с числом хромосом ( в % )		
	45	46	47
Когерентная вода	4,0	96,0	0
Контроль клеток	2,0	96,0	2,0

Представленные в таблице 2 данные свидетельствуют о том, что воздействие когерентной воды не оказывало существенного влияния на кариотип клеток и не вызывал аберраций (поломок) хромосом.

#### 4. Изучение токсичности когерентной воды *in vitro*

Когерентная вода добавлялась в питательную среду RPMI-1640 в соотношении 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600. Разведенная питательная среда по 0,1 мл вносили в лунки микропланшет, в которых выращены перевиваемые культуры клеток L-41. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты изучения токсичности когерентной воды от соотношения разведения.

Воздействие	1:1	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800
Когерентная вода	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Контроль клеток	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Примечание: "-----" - отсутствие дегенерации

Из представленной таблицы видно, что когерентная вода не оказывает токсического воздействия на культуру клеток.

Токсичность когерентной воды исследовали в опытах *in vivo* на белых беспородных мышах.

*Per os* с помощью зонда вводили по 0,5 мл когерентной воды в разведении 1:1, 1:10, 1:100. На каждое разведение использовали по 10 мышей, наблюдение проводили в течение 10 дней.

В результате проведенных исследований было показано, что препарат в исследуемых разведениях не токсичен. Все мыши в исследуемые сроки остались живыми и активными.

## 5. Изучение антигерпетической активности когерентной воды

Для изучения антигерпетического действия когерентной воды была использована модель герпетического менингоэнцефалита. Данная модель удобна для оценки выраженности симптоматики, отличается 100% воспроизводимостью и не требует применения дополнительных контролей. Развитие клинических симптомов заболевания начиналось на 5-6 сутки с момента инфицирования, достигало максимума к 13-14 суткам и далее отмечалось уменьшение выраженности симптоматики с последующим выздоровлением выживших животных. Наличие острой герпетической инфекции подтверждалось методом иммунофлюоресценции. Так, наиболее интенсивное свечение наблюдалось в тканях головного мозга (особенно в стволовых отделах), которое появлялось через 6-7 суток с момента инфицирования, что соответствует моменту появления клинических признаков заболевания. Менее интенсивное свечение (+ или ++) отмечалось в селезенке и отсутствовало в печени и легких. Летальность животных, инфицированных вирусом герпеса простого, составила 100%.

Для моделирования экспериментальной герпетической инфекции использовали вирус герпеса простого 1 типа. Вирус прошел в лаборатории 28 пассажей через мозг белых мышей. До использования в опыте вирус сохраняли в 50% растворе глицерина на фосфатном буферном растворе при температуре 10-15°C.

В опытах были использованы белые беспородные мыши весом 14-16 г. Вирусосодержащий материал вводили мышам внутрь мозга в объеме 0,03мл. Величина заражающей дозы в опытах равнялась 1-10 ID<sub>50</sub> (мышиных летальных доз).

Когерентную воду вводили однократно по 0,2мл внутрибрюшинно по следующим схемам: до инфицирования - профилактическая схема введения; через 24 часа после заражения вирусом герпеса - лечебная схема.

Каждый опыт включал 2 группы мышей:

- 1 – мыши под воздействием когерентной воды + вирус герпеса,
- 2 – мыши, которым вводили физиологический раствор + вирус герпеса.

Оценку активности когерентной воды проводили путем сравнения летальности мышей в опытной и контрольной группах. При этом учитывали:

- процент летальности животных,
- кратность защиты (КЗ) – кратность уменьшения количество павших мышей в опытной группе по сравнению с контрольной,
- индекс эффективности (ИЭ) препарата вычисляли по формуле:

$$\text{ИЭ} = \frac{\text{кратность защиты} - 1}{\text{кратность защиты}} \times 100\%$$

### кратность защиты

На первом этапе исследования была изучена активность когерентной воды. Зараженным герпесом животным вводилась когерентная вода каждые 24 часа до окончания опыта.

Результаты исследований антигерпетической активности когерентной воды при профилактическом воздействии на мышей приведены в таблице 4.

Таблица 4. Антигерпетическая активность когерентной воды.

Препарат	Количество мышей	Из них погибли		Кратность защиты	Индекс эффективности
		всего	процент		
Когерентная вода	12	6	50	2,0	50,0
Плацебо	14	14	100		

В результате проведенных исследований установлено, что когерентная вода обладает защитным и лечебным действием в отношении герпетической инфекции.

## 6. Изучение влияния когерентной воды на репродукцию вируса везикулярного стоматита

Изучение влияния когерентной воды на репродукцию вируса везикулярного стоматита (ВВС) проводили в перевиваемой культуре клеток L41 (лимфобластоидные клетки человека). Клетки выращивали в среде RPMI-1640 + 10% фетальной сыворотки + антибиотики.

Вирус везикулярного стоматита, штамм Индиана, получен из музея вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского (РАМН, г. Москва). Инфекционный титр в культуре клеток L41 составлял 4,0-4,5 lg ID<sub>50</sub>. Монослой клеток L-41 выращивали в пробирках, затем в пробирки вносили вирус везикулярного стоматита в дозе 100 ID<sub>50</sub> и клетки обрабатывались когерентной водой. В качестве контроля служили культуры, обработанные только ВВС и клетки, не подвергавшиеся никаким воздействиям. Через 24 часа культивирования при 37°C, когда в пробирках с контролем ВВС наблюдалась полная дегенерация монослоя клеток, в культуральной среде опытных и контрольных культур определяли инфекционный титр ВВС. Результаты исследований влияния когерентной воды на репродукцию ВВС представлены в таблице 5.

Таблица 5. Влияние когерентной воды на репродукцию вируса везикулярного стоматита.

Препарат	Титр вируса в lg ID <sub>50</sub>	Ингибция вируса в lgID <sub>50</sub>	P
Когерентная вода	3,0	3,0	<0,001
Контроль	5,0	-	

В результате проведенных исследований установлено, что когерентная вода достоверно ингибирует репродукцию вируса везикулярного стоматита на 2 lg ID<sub>50</sub>.

## 7. Изучение интерферогенной активности когерентной воды

Интерферогенную активность когерентной воды исследовали в экспериментах *in vitro*. Для этого были использованы лейкоциты доноров человека. К 3 мл последних добавляли 0,1 мл когерентной воды, инкубировали смесь при 37°C в течение 18 часов. Затем в надосадочной жидкости определяли активность интерферона по методу подавления цитопатогенного действия вируса везикулярного стоматита в гомологичной перевиваемой культуре клеток L41 (лимфобластоидные клетки человека). Культуру выращивали в среде роста, состоящей из питательной среды RPMI-1640 + 10 % фетальной сыворотки + антибиотики.

К монослою выращенных в плашках клеток добавляли разведения культуральной жидкости, содержащей когерентную воду (после инкубации с лейкоцитами) и инкубировали при 37° С в течение 24 и 72 часов, после надосадочную жидкость удаляли и вносили вирус везикулярного стоматита (ВВС) в дозе 100 ТЦД<sub>50,0,1 мл</sub>. В качестве контролей служили культуры клеток, обработанные ВВС и клетки, не подвергавшиеся никакой обработке. Опытные и контрольные культуры инкубировали при 37°C в течение 24 и 72 часов.

Определение активности интерферона осуществляли через 24 и 72 часа, когда доза внесенного ВВС вызывала полную дегенерацию клеток в контроле вируса, при отсутствии дегенерации в интактной культуре клеток. За титр интерферона принимали величину, обратную разведению когерентной воды, при котором культура в 50% лунок была полностью защищенной от цитопатогенного действия вируса везикулярного стоматита.

Результаты изучения интерферогенной активности когерентной воды представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Интерферогенная активность когерентной воды.

Препарат	Время инкубирования, час	Активность интерферона в ед.акт/мл
Когерентная вода	24	168
	72	360

Таким образом, когерентная вода проявляет выраженную интерферогенную активность.

## 8. Изучение анти-ВИЧ активности когерентной воды

Важнейшим вопросом в ингибировании резистентных вирусных инфекций является предупреждение прикрепления и проникновения вирионов в клетки хозяина.

Известно, что ВИЧ способен проникать далеко не во все виды клеток крови, а только в те, которые несут на своей поверхности специальный белок-рецептор - CD4+, к которому вирус легко присоединяется. Белок вируса под названием gp120,

расположенный на его поверхности, находит белок-рецептор CD4+ на поверхности клетки и плотно связывается с ним. Этому взаимодействию способствуют дополнительные белки, называемые корецепторами. Название основных корецепторов для ВИЧ - CCR5 и CXCR-4. В нормальных клетках они служат полноценными рецепторами для специфических клеточных белков-регуляторов - хемокинов. А для взаимодействия клеток с ВИЧ они играют роль катализатора в реакции полимеризации белка gp120 с белком-рецептором CD4+. Если такая реакция не произойдет, вирус проникнуть в клетку не может.

Активация реакции синтеза белка gp120 с белком-рецептором CD4+ может быть объяснена их переходом с одной поверхности потенциальной энергии на другую. В качестве посредника этого перехода является корецептор, выполняющий роль спинового катализатора. Корецептор обуславливает изменение спиновых состояний молекулярной структуры белков gp120 и рецептора CD4+, что приводит к увеличению количества синглетных состояний реакционных пар и инициирования реакции полимеризации белков. Такая реакция, как правило, протекает безактивационно, т.е. энергия активации реакции близка к нулю. Образующаяся молекула находится в основном электронном состоянии. Реакция протекает быстро и эффективно, если молекула имеет возможность отдать энергию, выделяющуюся при образовании связи, другим частицам или перераспределить ее между многими колебательными модами.

Как уже отмечалось, спиновая релаксация организма человека приводит к конверсии спиновых состояний из синглетных в триплетные, что обеспечивает торможение реакции синтеза белков gp120 и рецептора CD4+,. Эта же релаксация приводит к снятию клеточного стресса (энергетическая разрядка) и предупреждению активации вирусов.

Изучение влияния когерентной воды на репродукцию ВИЧ проводили на новой модели ВИЧ-инфекции - в клетках COS, которые имеют универсальную чувствительность к РНК и ДНК-содержащим вирусам, в том числе к ВИЧ.

Монослой клеток COS, выращенный в плашках, инфицировали ВИЧ в дозе 100 ID<sub>50</sub>, культивировали на протяжении 5-7 дней, собирали культуральную жидкость и в ней определяли p24 при помощи тест-системы Virognostica Organon. Затем 10-кратными разведениями инфицировали культуру клеток COS для определения инфекционного титра. Результаты представлены в таблице 7.

Модель COS использовали для изучения влияния когерентной воды на репродукцию ВИЧ. Для этой цели монослой клеток COS инфицировали ВИЧ в дозе 100 ID<sub>50</sub> и обрабатывали когерентной водой по той же схеме, что и в предыдущих исследованиях. Инкубировали при 37°C на протяжении 7 дней, а затем в пробах определяли экспрессию p24 ВИЧ и его инфекционный титр.

Таблица 7 - Характеристика ВИЧ-инфекции.

		Уровень экспрессии p24 ВИЧ



Обработка культуры	Дни культивирования	p24, нг/мл	Инфекционный титр в lg ID <sub>50</sub>
ВИЧ	5	3,640	5,0
ВИЧ	7	3,666	6,0
Интактная культура	-	-	-

Результаты влияния когерентной воды на репродукцию ВИЧ представлены в таблице 8.

Таблица 8. Влияние когерентной воды на репродукцию ВИЧ.

Препараты	Экспрессия, пг/мл	Инфекционный титр ВИЧ в lg ID <sub>50</sub>
Когерентная вода	630	4,0
Контроль ВИЧ	650	5,6

В результате проведенных исследований установлено, что когерентная вода ингибировала репродукцию ВИЧ на 1,6 lg ID<sub>50</sub>, что отразилось как на ингибировании экспрессии антигена p24 ВИЧ-1, так и на снижении инфекционного титра на 1,5 lg ID<sub>50</sub>.

## 9. Пилотный эксперимент по ингибированию ВИЧ *in vivo*

Схема лечения универсальна. Пациент ежедневно осуществляет прием 250 мл когерентной воды вечером перед сном. Прием воды производится малыми глотками в течение 5 минут. При этом стакан с когерентной водой следует не выпускать из руки до конца ее приема. После приема пациентом когерентной воды, водная среда организма пациента переходит в когерентное состояние (эффект синхронизации). Это состояние удерживается в течение 15 сек., а затем, в течение 12 час протекает процесс декогеризации.

Продолжительность лечения может составлять минимум 3 месяца и зависит как от вирусной нагрузки, так и от вызванных ими осложнений.

Эксперимент проводился в ЮАР с пациентами (волонтерами), инфицированными ВИЧ, с различным содержанием Т-лимфоцитов CD4+ в крови. Одна часть пациентов принимали только когерентную воду, а другая часть когерентную воду и антиретровирусные лекарства (АРВЛ). Результаты эксперимента приведены в таблице 9.

Таблица 9. Влияние когерентной воды на содержание лимфоцитов CD4+ ВИЧ инфицированных пациентов.

Пациент	Принимаемые препараты		Время приема, дни	Содержание CD4+ в крови			
	вода	АРВЛ		до эксперимента		после эксперимента	
				ед/мкл	%	ед/мкл	%
Michael Makhoba	+	-	10	20	3,2	207	9,06
Rachel Ngcayiya	+	-	10	90	6,96	154	11,05
Mercia Dube	+	-	10	419	21,0	597	21,65
Petrus Tshabalala	+	+	30	101	6,68	156	7,54
John Moroazwi	+	+	30	271	18,8	453	21,25
Alfred Zulu	+	+	60	448	20,19	642	20,77