

Антивирусни ефекти на вода, Oxidal с Methylene Blue (метиленово синьо) и колоидно сребро. Възможен механизъм за въздействие върху коронавирус SARSr-CoV и SARSr-CoV-2 със заболяване COVID-19

проф. Игнат Игнатов

Научноизследователски център по медицинска биофизика, София,
България

УВОД

Коронавирусът **COVID-19** е РНК вирус. Той започва разпространението си в края на 2019 г. и началото на 2020 г. в Китай и води до остро инфекциозно заболяване 2019-nCoV. Той е близък до *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARSr-CoV)* и новият вирус е означен като SARS-CoV-2. Неговият геном е едноверижен с положителна полярност ((+) верига). Съдържа нуклеотиди със спирална симетрия (1). Коронавирусът **SARSr-CoV** реплицира генетичния материал чрез копиране на ензима *RNA-dependent RNA polymerase* (2). Авторът разглежда комплексен метод за въздействие върху SARS-CoV, който включва употреба на алкална вода с отрицателен окислително-редукционен потенциал (ORP), хранителна добавка Oxidal и колоидно сребро.

Ключови думи: SARSr-CoV, вода Католит, Oxidal с метиленово синьо, колоидно сребро

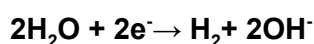
* e-mail на автора за кореспонденция: mbioph@abv.bg

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Коронавирусът **SARSr-CoV** има две аминокиселини *valine* и *leucine* (1). Те водят до силна хидрофобност. В **SARSr-CoV** има взаимодействие между *E* and *S* протеини. Това взаимодействие е с дисулфатни връзки. Вирусните инфекции се получават основни чрез *C*-терминирани *target proteins* (1). Те са положително заредени.

Вода Католит се получава при електролиза в катодното отделение на електролизера.

Валидна е реакцията за взаимодействие на вода Католит и с вируса (3):



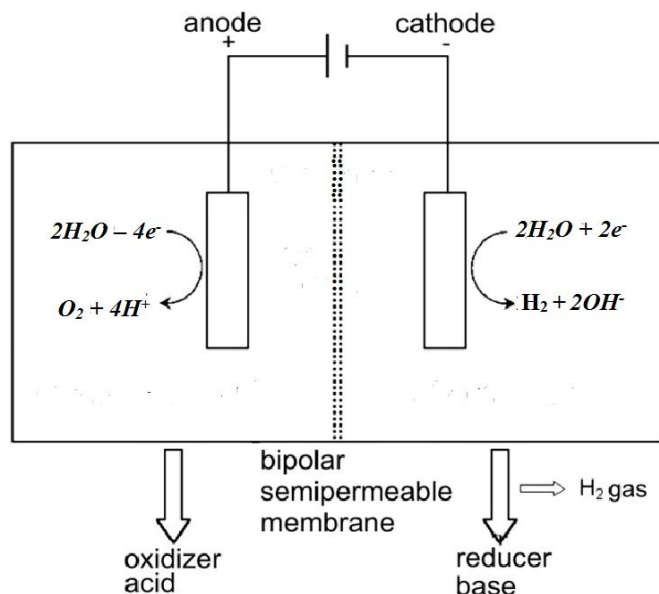
Отделят се свободни електрони, които неутрализират положително заредените *C*-протеини, които водят до вирусни инфекции. Дозите са високи и се получават значими ефекти. Метиленовото синьо има инхибиторното действие (Oz et al., 2011) (4). То е с химична формула: **C₁₆H₁₈ClN₁₃S**. Има голям брой научни изследвания *Methylene blue* (МВ) със Западно-нилски вирус (5), СПИН – свързаната саркома на Капоши (6) и РНК вируси (7). Има положителни резултати с прогерия. Те показват потенциала на метиленовото синьо за взаимодействие с клетъчната мембрана с ефекти върху АТФ и митохондрии. **Oxidal** не се нуждае от фотоактивация.

Колоидното сребро **Ag⁺** има потискащ ефект върху респираторни ензими. Така се прави превенция срещу промени на ензимите (8). Колоидното сребро **Ag⁺** подтиска копирането и по този начин неутрализира ефектите на **SARSr-CoV-2**.

2. МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ

2.1. Електролизер за вода Католит

Електролизерът има две части, които са разделени с полупропусклива мембрана (9). Анолитът се получава от анода и е киселинна фракция. Католитът се получава при катода и е алкална фракция. Когато електричният ток преминава през водата има редокс реакции върху повърхността на електродите. Католитът е с отрицателен окислително-редукционен потенциал в mV. Анолитът е с положителен окислително-редукционен потенциал в mV. Функционалната схема и реакциите са показани на **Фигура 1**.



Фигура 1. Схема на електролизер

2.2. Oxidal

Oxidal е стерилен течен разтвор и съдържа:

- 1% „метиленово синьо” с химична формула: $C_{16}H_{18}ClN_{13}S$;
- 1% кафеин;
- 1% бензоева киселина с химична формула: C_6H_5COOH (като стабилизатор).

2.3. Колоидно сребро

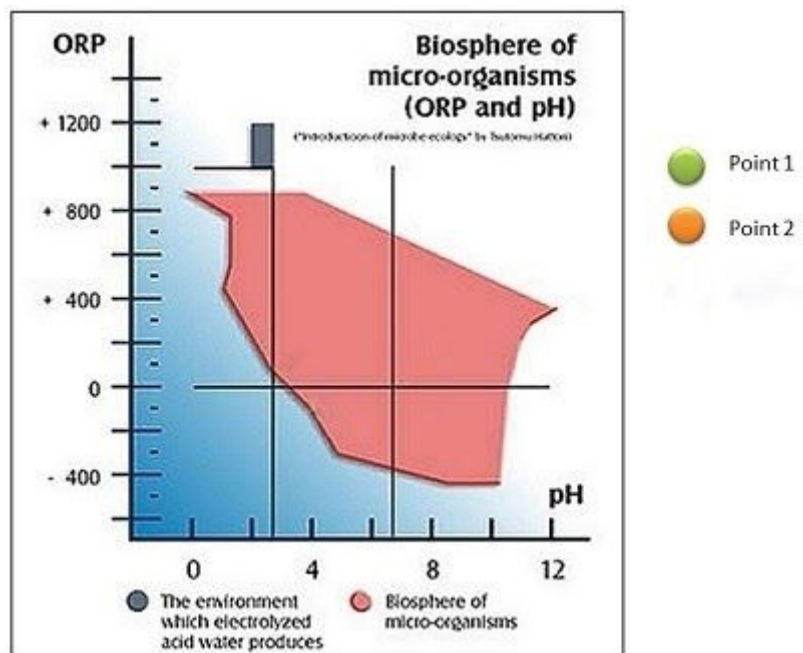
За получаването на колоидно сребро са необходими:

1. Сребърен електрод с чистота 99.99%
2. *Tetra-n-butylammonium bromide* (ТВАВ)-амониева сол с бромид
3. *Acetonitrile* – оцветена течност с химична формула CH_3CN

Получаването на колоидно сребро може да бъде при електролиза (Mosin, Ignatov, 2013) (10). Използва се тетрабутил-амониев бромид в ацетонитрил като течна среда за електролиза. При метода на *Mosin – Ignatov* се получава колоидно сребро с размери 2–7 nm в разтвор от *Tetra-n-butylammonium bromide* в *acetonitrile*. Анодът е сребърен, а катодът от графит.

В процеса на електролиза настъпва частичното разтваряне на сребърния анод, което води до насищане на разтвора с Ag^+ . При зададени параметри на електричния ток и

напрежение върху електрода. Концентрацията на разтвора Ag^+ се определя от времето на работа на източника на ток и количеството на водния разтвор.



Фигура 2. Зависимост между стойностите на pH и ORP за съществуване на микроорганизми

3. РЕЗУЛТАТИ И МАТЕРИАЛИ

3.1. Антивирусни ефекти на вода Католит

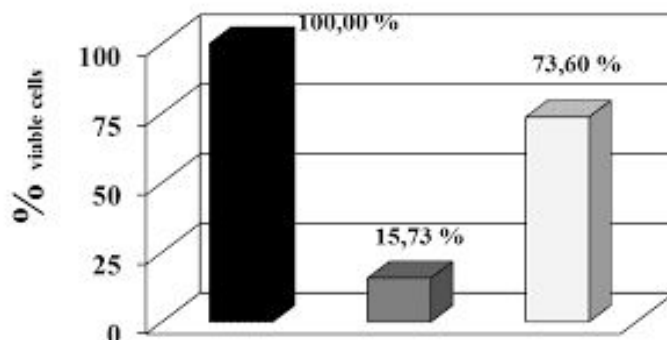
На **Фигура 2** е показана зависимост между стойностите на pH and ORP (Karadzhov et al, 2014) за съществуване на микроорганизми (11). С червената фигура е указана биосферата на развитие на микроорганизмите. Със син цвят е указана зоната на подтискане на тяхното развитие. За вода Католит за силен антивирусен ефект са необходими следните стойности:

- за pH=9.5 ORP \geq (-650) mV;
- за pH=10.0 ORP \geq (-500) mV;
- за pH=10.5 ORP \geq (-450) mV

Първата диаграма на **Фигура 3** показва процентът на жизнеспособните клетки в различни видове води (12) (Miloshev, Gluhchev et al. 2015). Бактериалните клетки на бактерията E. coli DH5a във вода са 100%. Във вода католит на втората диаграма 15.73 % от клетките на E. coli съществуват. При вода анолит 73.60 % от клетките са жизнени.

Получени са положителни резултати с вода анолит при *the Virus of Classical Swine Fever Virus* (Karadzhov, Ivanova et al., 2014) (13) и биоцидни ефекти върху *Gram-negative Pathogenic Bacteria* (14).

Вода Католит има структура на водородните връзки между водните молекули с противовъзпалителен и анти туморни ефекти. (Ignatov, Mosin, 2013) (15). Вода Католит стимулира функцията на митохондриите и АТФ (Ignatov et al, 2019; 2020)(16, 17). Наличието на насцентен водород в Католит има антивирусно въздействие (Vassileva, Mehandjiev et al., 2019)



Фигура 3. Процент на жизнеспособни клетки *E. coli* DH5a след електрохимично въздействие с води Католит и Анолит по отношение на вода, която не е електрохимично активирана

(18). Има доказателства за ефекти върху Graffi tumor на хамстери с подобряване на кръвни и имунни показатели (19, 20, 21).

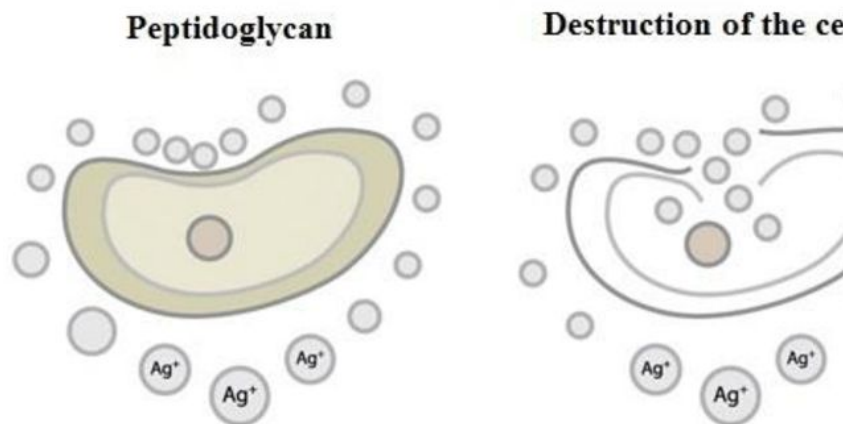
3.2. Антивирусни ефекти на *Oxidal*

Когато навлиза в митохондриите метиленовото синьо (methylene blue, MB) действа като допълнителен електронен източник. MB реагира като допълнителен електронен източник. То първо се редуцира до MBH 2 чрез NADH-dehydrogenase в complex I и след това се реоксидира до MB чрез cytochrome c. Цикличността между тези две форми създава електронен пренос за синтез на АТФ като основна функция на митохондриите (22). Още по-важно е, че се предотвратява загубата на електрони и образуването на оксидантни формации, които са токсични за митохондриите (23). MB също подобрява функцията на митохондриалната функция с включване на PGC1 α като централен медиатор на митохондриалния биогенезис (24) и като няколко ключови електроно пренасящи верлиги (ETC). Компонетите cytochrome oxidase (COX II и COX IV (23) . Изводът е, че метиленовото синьо съдейства за функцията на митохондриите и ROS продуктите.

Повишените ROS са докладвани за клетки при Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS) (Viteri et al., 2010) (25); Lattanzi et al., 2012) (26). Допълнително намалява регулацията на митохондриалните протеини oxidative phosphorylation proteins,

намаляващи нивата на АТФ и митохондриалната дисфункция бе докладвана за HGPS fibroblasts и също за HGPS модели с мишки (Rivera-Torres et al., 2013)(27), Villa-Bellosta et al., 2013) (28). Тези доказателства предполагат митохондриални дефекти в HGPS.

Все още обаче не е ясно до каква степен митохондриалната дисфункция допринася за фенотипите на преждевременно стареене, свързани с HGPS. В проучване се характеризира специфични за HGPS митохондриални дефекти и са проучени механизмите, залегнали в основата на тези аномалии.



Фигура 4. Взаимодействие на Ag^+ йони в микробна клетка:

- a) – мембранен протеин *peptidoglycan* и неговото взаимодействие с Ag^+ йони;
- b) – процес на проникване на Ag^+ йони в микробната клетка (Dondysh, 1964).

Освен това е тествано метиленово синьо (MB), антиоксидантно съединение, за което се знае, че стимулира митохондриалната функция. Резултатите показват, че лечението с MB подобрява не само морфологията и функциите на митохондриите, но също така изглежда, че специфично спасява фенотипите на преждевременно стареене в HGPS ядра. Изследването сочи ново обещаващо лечение за HGPS.

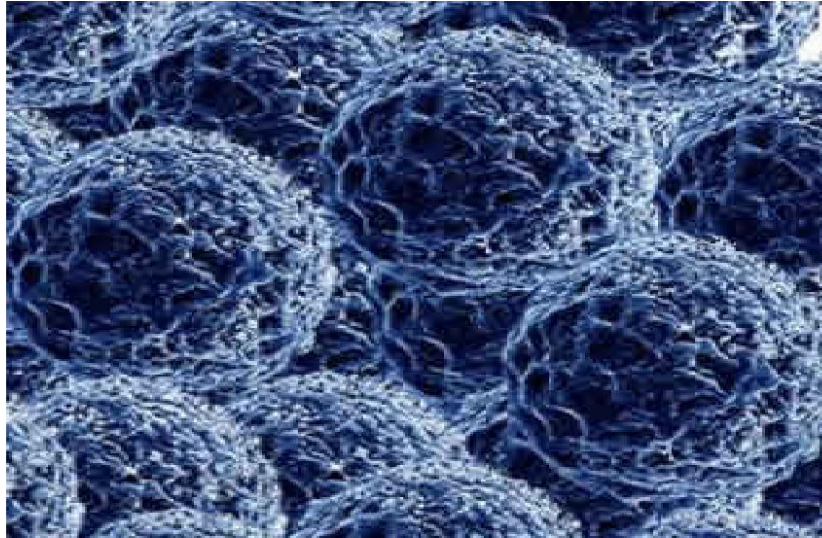
3.3. Антивирусни ефекти на колоидното сребро

Колоидното сребро Ag^+ има инхибиращ ефект върху респираторни ензими на микроорганизмите. Ag^+ се вгражда в реакционния център на ензими. Това възпрепятства по-нататъшното изменение на ензимите. Тъй като мембраната на клетките на бозайниците не съдържа пептидогликани Ag^+ няма инхибиращ ефект (32, 33). На фиг. 4 е показан механизмът (Dondysh, 1964) (32).

Коронавирусът се реплицира чрез копиране на генетичния материал чрез ензим RNA-dependent RNA polymerase. Колоидното сребро Ag^+ инхибира това копиране и така се неутрализира ефектите на **COVID-2019**.

Получени са резултати за **SARS-CoV**, че вирусът въздейства на митохондриите, за да да намали имунитета на човека (Shi, 2014)(29)(Nelemans, 2019) (30). **Oxidal** стимулира функцията на митохондриите и АТФ. Изследваните щамове на *S. aureus* и *E. coli* показват по-висока чувствителност към **Oxidal** в сравнение с контролния антибиотик Thiamphenicol, но разликите не са значими (Popova, Petrova, Ignatov, Karadzhov, 2020) (31).

Фигура 5 показва електронна фотография на колоидно сребро (34) (Darroudi et al., 2011)



Фигура 5. Електронна фотография на колоидно сребро с размер 5 nm (Darroudi et al., 2011)

3.4. Антивирусни дози на вода Католит, **Oxidal** и колоидно сребро

При употреба на вода Католит се препоръчва това да бъде един час преди или след храна. Необходимо е рН да бъде над 9.5 и ORP в интервала (-700 - -400) mV. С увеличаване на рН може да се намалява ORP и това увеличава ефекта на вода Католит. **Oxidal** може да се прилага в доста големи дози, но изследванията с хора показват, че оптималните дози на "methylene blue" за човек на ден са около 15 mg-16 mg. При употребата на колоидно нано сребро дозите е необходимо да бъдат точно определяни Доза за един ден: 5 µg микрограма на 1 кг телесна маса 5 µg x70 kg body weight=350 µg = 0.00035 g

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторът предлага употребата на три продукта water – Catholyte, **Oxidal** and Colloidal Silver при превенция и допълнителен метод за терапия при инфекциозното заболяване 2019-nCoV предизвикано от вируса (**SARSr-CoV**). Ефектите са върху клетъчната мембрана, АТФ и митохондрии.

Точното дозиране води до следните ефекти:

1. Отрицателните електрони намаляват положителния заряд на С протеина и така се намалява броят на навлезлите вируси в клетката.
2. Вирусът SARS-CoV въздейства на митохондриите, за да да намали имунитета на човека. **Oxidal** стимулира функцията на митохондриите и АТФ.
3. Колоидното сребро **Ag⁺** има инхибиращ ефект върху респираторни ензими на микроорганизмите. **Ag⁺** се вгражда в реакционния център на ензима. Това възпрепятства по-нататъшното изменение на ензима. Тъй като мембраната на клетките на бозайниците не съдържа пептидогликани **Ag⁺** няма инхибиращ ефект.

Препоръчителни са и високи дози витамин С.

Един от изследователите Wolfgang Luerke предлага хипер имунизирание на телета с SARS-CoV-2. Така може да се получи серум с антитела. Той е под формата на аерозол за вдишване и се получава пасивен Имунитет. В клетките се образуват антитела и от пасивен имунитетът минава в пасивен.

Препратки:

1. Lai, J., Luo, S., Ho, L. Signaling Pathways of SARS-CoV In Vitro and In Vivo , Analysis of Proteins that Interact with Nucleocapsid Protein of SARS-CoV using 15-mer Phage-displayed Library , Biochem. Pharmacol., 2018; 156:348-356.
2. Kim, S.; Kim, D.; Lee, B. Insufficient Sensitivity of RNA Dependent RNA Polymerase Gene of SARS- CoV-2 Viral Genome as Confirmatory Test using Korean COVID-19 Cases. Preprints 2020.
3. Ignatov, I., Gluhchev, G., Karadzhov, G., Yaneva, I., Valcheva, N., Dinkov, G., Popova, T., Petrova, T., Mehandjiev, D., Akszjonovich, I. Dynamic Nano Clusters of Water on Waters Catholyte and Anolyte: Electrolysis with Nano Membranes, Physical Science International Journal, 2020, 24 (1): 46-54.
4. Oz, M. et al. Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System, Medicinal Research Reviews, 2011; 31 (1): 93-117.
5. Papin J.F.; Floyd R.A.; Dittmer D.P., Methylene Blue Photoinactivation Abolishes West Nile Virus Infectivity in Vivo. Antiviral Research; 2005; 68 (2): 84–7.
6. Tardivo, J.P.; Del Giglio, A.; Paschoal, L.H.; Baptista, M.S. New Photodynamic Therapy Protocol to Treat AIDS-related Kaposi's Sarcoma, Photomedical Laser Surgery, 2006; 24 (4): 528–31.
7. Floyd R.A.; Schneider J.E.; Dittmer D.P. Methylene blue Photoinactivation of RNA Viruses, Antiviral Research, 2004; 61 (3): 141–51.

8. Ignatov, I., Mosin, O.V. Methods for the Preparation of Colloidal Silver Nanoparticles and Spheres of Their Practical Application Field, *Bulletin of Science and Education*, 2013;3; 30–42.
9. Bahir, V.M., Liakumovich, A.G., Kirpichnikov, P.A., Spector, L.E., Mamajanov, U.D. The Physical Nature of the Phenomenon of Activation Substances. *Izv. UzSSR. Ser. Tehn. Sciences*, (1983)1: 60–64.
10. Mosin, O. V., Ignatov, I. Preparation of Nanoparticles of Colloid Silver and Spheres of Their Practical Using, *Nanoengineering*, 2013; 5: 23-30.
11. Karadzov, S., Atanasov, A., Ivanova, E., Mosin, O. V., Ignatov, I. Mathematical Models of Electrochemical Aqueous Sodium Chloride Solutions (Anolyte and Catholyte) as Types of Water. Study of the Effects of Anolyte on the Virus of Classical Swine Fever Virus, *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 2014; 5: 30-55.
12. Gluhchev, G., Ignatov, I., Karadzov, S., Miloshev, G., Ivanov, N., Mosin, O. V. Studying of Virucidal and Biocidal Effects of Electrochemically Activated Anolyte and Catholyte Types of Water on Classical Swine Fever Virus (CSF) and Bacterium *E. coli* DH5, *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*. 2015; 13: 1-17.
13. Ignatov, I., Karadzov, S., Atanasov, A., Ivanova, E., Mosin, O. V. Electrochemical Aqueous Sodium Chloride Solution (Anolyte and Catholyte) as Types of Water. Mathematical Models. Study of Effects of Anolyte on the Virus of Classical Swine Fever Virus, *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 2014; 8: 1-28.
14. Popova, T., Petrova, T., Karadzov, S. Investigation of the Biocidal Effect of Electrochemically Activated Aqueous Sodium Chloride Solution on Gram-negative Pathogenic Bacteria, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2016; 5(1): 624-632.
15. Ignatov, I., Mosin, O. V. Structural Mathematical Models Describing Water Clusters, *Journal of Mathematical Theory and Modeling*, 2013; 3 (11): 72-87.
16. Ignatov, I. Electrochemically Activated Water Catholyte for Activation of Shape and Recovery in the Sport, *Int. Conference on Medicine and Football*, Sofia, Bulgaria, *Journal of Medicine and Sport*, 2019; 3-4.
17. Ignatov, I., Gencheva, N., Marinov, T., Yaneva, I., Angelcheva, M., Dinkov, G., Angushev, I. Electrochemically Activated Water Catholyte for the Activation of Hydrogen Ions and ATP for Sport's Shape and Recovery, *International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports*, 2020.
18. Vassileva, P., Voykova, D., Ignatov, I., Karadzov, S., Gluhchev, S., Ivanov, N., Mehandjiev, D. Results from the Research of Water Catholyte with Nascent (Atomic) Hydrogen, *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*, 2019; 52: 7-11.

19. Toshkova, R., Ignatov, I., Zvetkova, E., Gluhchev, G. Effects of Catholyte Water on the Development of Experimental Graffi Tumor on Hamsters, *European Journal of Medicine*, 2019; 7(1): 45-56.
20. Toshkova, R., Zvetkova, E., Ignatov, I., Gluhchev, G. Effects of Catholyte Water on the Development of Experimental Graffi Tumor on Hamsters, *Bulgarian Journal of Public Health*, 2019 11, (3): 60-73.
21. Ignatov, I., Toshkova, R., Gluhchev, G., Zvetkova, E. Results with IR Spectroscopy of CortiNon+ on the Development of Experimental Graffi Tumor on Hamsters, *European Reviews of Chemical Research*, 2019; 6(2): 61-67.
22. Tardivo, J. Methylene Blue in Photodynamic Therapy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005; 2 (3): 175-191.
23. Atamna, H., Kumar, R. Protective Role of Methylene blue in Alzheimer's disease via Mitochondria and Cytochrome c Oxidase, *J Alzheimers Dis.* 2010; 20 (Suppl 2), S439–452.
24. Xiong, Z. M. et al. Methylene Blue Alleviates Nuclear and Mitochondrial Abnormalities in Progeria, *Aging Cell*, 2016; 15: 279–290.
25. Viteri G, Chung YW, Stadtman ER (2010) Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mech. Ageing Dev.* 2010; 131: 2–8.
26. Lattanzi G, Marmioli S, Facchini A, Maraldi N.M. Nuclear Damages and Oxidative Stress: New Perspectives for Laminopathies, *Eur. J. Histochem*, 2012; 56: 284–288.
27. Rivera - Torres J, et al, Identification of Mitochondrial Dysfunction in Hutchinson - Gilford Progeria Syndrome through Use of Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture. *J. Proteomics.* 2013; 91:466–477.
28. Villa - Bellosta R, et al, (2013) Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson - Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* 127, 2442–2451
29. Nelemans, T., KikkertViral, M. Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections, 2019; 11(10), 961.
30. Schoeman, D, Fielding, B., Coronavirus Envelope Protein: Current Knowledge, 2019, *Virology Journal*, 69.
31. Popova, T., Petrova, T., Ignatov, I., Karadzhev, S. Preliminary in vitro Investigations on the Inhibitory Activity of the Original Dietary Supplement Oxidal ® on Pathogenic Bacterial Strains, 2020, in press.
32. Dondysh, L.M. Inhibitory Effect of Silver on Some Enzymatic Systems. Questions and Exogenous Organic Neuropsychiatric Disorders/ in Materials of Scientific Conf., State

Institute of Psychiatry USSR, Ministry of Health. – Moscow: State. Institute of Psychiatry USSR Ministry of Health, 1964; 2: 143–165.

33. Mosin, O.V., Ignatov, I. Methods for the Preparation of Colloidal Silver Nanoparticles, *Nano and Microsystems*, 2014; 2: 46–52. 34. Darroudi, M., Ahmad, M.B., Zamiri, R. Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2011; 6: 677–681.