

# Protirakovinný efekt ionizované zásadité vody

Tato vědecká studie byla převzata z *Journal of International Society of Life Information Science, Japan, 2004*.

Kyu-Jae LEE<sub>1,2</sub>, Seung-Kyu PARK<sub>1,2</sub>, Jae-Won KIM<sub>1</sub>, Gwang-Young KIM<sub>1</sub>, Young-Suk RYANG<sub>5</sub>, Geun-Ha KIM<sub>1</sub>, Hyun-Cheol CHO<sub>3</sub>, Soo-Kie KIM<sub>2,3</sub>, and Hyun-Won KIM<sub>2,4</sub>



1 Dept. of Parasitology, 2 Institute of Basic Medical Sciences, 3 Dept. of Microbiology, 4 Dept. of Biochemistry, Wonju College of Medicine, Yonsei Univ. ( Wonju , Korea) 5Dept. of Biomedical Laboratory Science and Institute of Health Science, College of Health Science, Yonsei Univ. ( Wonju , Korea)

**Anotace:** Některé minerály během rozpuštění ve vodě produkují ionizovanou zásaditou vodu s vysokým obsahem pH a nízkým oxidačně redukčním potenciálem (ORP). Ionizovaná zásaditá voda prokázala významné protirakovinné účinky. U myši C56BL/6, jenž byly podkožně nebo intraperitoneálně naočkovány B16 melanomovými buňkami, se při používání ionizované zásadité vody projevilo výrazné zpoždění růstu nádoru a míra přežití byla významně prodloužena. Při aplikaci buněk do ocasní žíly se snížil počet B16 melanomových kolonií, a tak se i utlumil výskyt metastáz. Při užívání ionizované zásadité vody se také výrazně snížil počet volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species = ROS) s výjimkou sleziny, což je hlavní orgán imunity. I u normálních myši ovlivňovala ionizovaná zásaditá voda systémové cytokiny, jako např. Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) and Th2 (IL-4, IL-5), což ukazuje na významný imuno-modulační efekt. Jak efekt odklizení ROS, tak imuno-modulační efekt mohou být zdrojem protirakovinného efektu ionizované zásadité vody.

## ÚVOD

Reactive oxygen species (ROS) neboli volné kyslíkové radikály jsou jedním z hlavních zdrojů oxidačního poškození biologických makromolekul. Tyto nestabilní molekuly mohou způsobovat či zhoršovat řadu neléčitelných onemocnění jako například rakovinu, kardiovaskulární či neurodegenerativní nemoci, stejně jako stárnutí.<sup>1,2)</sup> Buněčné vychytávače (radical scavengers) jako například superoxidodismutáza (SOD), kataláza, glutathion peroxidáza, jsou přírodní obranné systémy proti volným radikálům. Vnější zdroje antioxidační ochrany zahrnují antioxidační vitamíny C a E, karoten a karotenoidy, stejně jako minerály jako selen a zinek. Hledání bezpečných a účinných antioxidantů bylo a zůstává předmětem intenzivního výzkumu.

Lidské tělo obsahuje 70% vody. Po napití se voda dostane do každého místa těla během 30 minut. Dokonce i hematoencefalická bariéra pro ni není žádnou překážkou. Nemá také téměř žádné vedlejší účinky. Pokud by voda sama o sobě mohla fungovat jako lapač volných radikálů, byl by to ideální antioxidant<sup>3)</sup>. V nedávné době bylo prokázáno, že elektrolyticky redukovaná voda s vysokým pH a významným negativně redukčním potenciálem má obdobný efekt jako super oxid dismutáza a kataláza, a chrání DNA proti poškození kyslíkovými radikály *in vitro*.<sup>4)</sup> Vyvinuli jsme minerální směs pro výrobu ionizované zásadité vody s vysokým pH a nízkým ORP, stejně jako elektrolyticky vyráběná voda. Minerální směs se snadněji přenáší a je méně nákladná než systém k produkci elektrolyzované vody. Tento článek ukazuje protinádorový účinek zásadité vody na zvířecím modelu.

## MATERIÁLY A METODY

### Ionizovaná zásaditá voda

Ionizovaná zásaditá voda byla vyrobena vložení směsi minerálů do lahve vody. Hodnota pH vody se zvýšila až na 10,5 a oxidačně redukční potenciál (ORP) se snížil na -200mv. Obsah minerálů byl zvyšován úměrně s časem.

## Zvířata a buňky

Myši C57BL/6 (4-5 týdnů staré) byly získány od Daehan Bio Link Co., Ltd. (Chungbuk Korea) a živeny standardní stravou a kohoutkovou vodou, než jim byla podána ionizovaná zásaditá voda. Myši B16 melanomové buňky byly udržovány v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) doplněné 5% na teplo citlivým plodovým hovězím sérem (fetal bovine serum = FBS) ve zvlhčené atmosféře v poměru 95% vzduch 5% CO<sub>2</sub> při 37°C. Vysoce metastazující skupina buněk B16 byla izolována z plíce C57BL/6 myši, která byla intraperitoneálně naočkována B16 buňkami. Buňky byly klonovány pomocí metody mezního ředění a vybrané klony byly poté naočkovány do myši. Tato metoda byla opakována třikrát a konečný klon s vysokým metastazujícím potenciálem byl označen jako B16-BL6 melanomové buňky.

## In vivo vyhodnocení protimetastatického účinku

Kultivované B16-BL6 melanomové buňky byly nashromážděny pomocí 2mM EDTA v PHS a poté třikrát propláchnuty v FBS. Celkem  $1 \times 10^6$  B16-BL6 melanomových buněk bylo nitrožilně zavedeno do ocasní žíly myši C57BL/6, které byly napájeny ionizovanou zásaditou vodou. Po 20 dnech byly myši usmrceny a následně jim byly vyňaty plíce pro spočítání kolonií metastazovaných B16-BL6 melanomových buněk.

## In vivo potlačení růstu nádoru

Kultivované B16-BL6 melanomové buňky byly nashromážděny pomocí 2mM EDTA v FBS a poté třikrát propláchnuty v FBS. Celkem  $1 \times 10^6$  B16-BL6 melanomových buněk bylo podkožně zavedeno do oblasti zad myši C57BL/6.

Délka dlouhé a krátké osy nádoru byla denně měřena a výsledky byly spočítány za použití vzorce  $ab^2/2$ , kde  $a$  je délka dlouhé osy a  $b$  je délka krátké osy. Křivka přežití byla vykreslena za použití Kaplan-Meier metody.

## Měření hladiny cytokinů pomocí metody ELISA

Koncentrace cytokinů v myším séru byla měřena pomocí standardní metody ELISA. Protilátky byly zakoupeny od firmy Pharmingen (USA): klony JES5-2A5 a JES5-16E3 pro IL-4; a klony R4-6A2 a XMG1-2 pro IL5. 96-jamková mikrodestička byla potažena 250 g protilátky a postupně byly přidány vzorky séra, biotinylovaná specifická protilátka, sekundární protilátka se streptavidinem a HRP a po promytí roztok o-phenylendiaminu. Enzymatická reakce byla zastavena 2N kyselinou sírovou. Absorbance byla měřena ELISA readrem při 490 nm.

## Stanovení volných kyslíkových radikálů (ROS)

Množství cytosolických ROS bylo měřeno pomocí oxidační metody 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)<sup>5</sup>. 12,5 M DCFDA bylo inkubováno v homogenátu jater, sleziny, plic nebo mozku a změna fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Relativní fluorescenční jednotka (RFJ) byla vypočtena na 1 mg proteinu v homogenátu.

**Obr. 1. Vliv ionizované zásadité vody na redukci volných radikálů u myši. (játra, plíce, ledvina, slezina):**

## VÝSLEDKY

### Efekt ionizované zásadité vody na růst nádoru a dobu přežití

Růst nádoru byl významně omezen u skupiny užívající ionizovanou zásaditou vodu. Po 10 dnech od podkožního zavedení B16 melanomových buněk do boku myši C57BL/6 byla hmota nádoru viditelná a následně pravidelně měřena. K desátému dni byla velikost nádoru pro skupinu užívající ionizovanou zásaditou vodu 0,27 cm<sup>3</sup>, zatímco pro skupinu užívající kohoutkovou vodu to bylo 0,48 cm<sup>3</sup>. K devatenáctému dni byla velikost nádoru pro skupinu

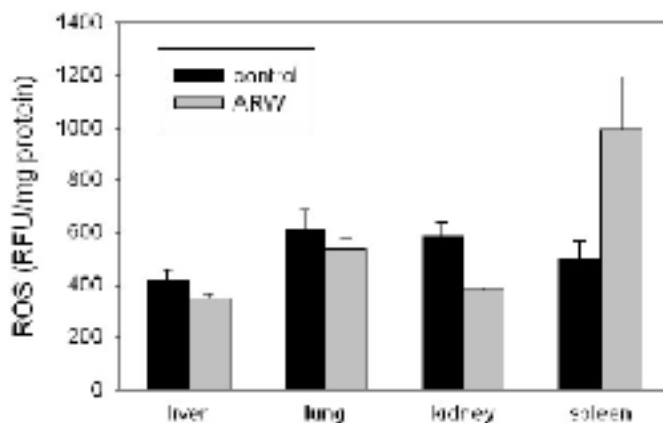
užívající ionizovanou zásaditou vodu 3,32 cm<sup>3</sup>, zatímco pro skupinu užívající kohoutkovou vodu to bylo 6,02 cm<sup>3</sup>, což prokazuje 54% útlum.

Dále byla po intraperitoneálním zavedení B16 melanomových buněk do C57BL/6 myši monitorována míra přežití. Ionizovaná zásaditá voda prodloužila průměrný čas přežití z 36 na 44 dnů.

## Vyhodnocení protimetastatické aktivity ionizované zásadité vody na B16 metastázy na plicích

Po nitrožilním zavedení B16 melanomových buněk do ocasní žíly C57BL/6 myši byl monitorován protimetastatický účinek ionizované zásadité vody. Po 15. dnech od zavedení byly myši usmrceny. Poté byly vyňaty plicní tkáně a porovnány metastazující léze. Skupina užívající ionizovanou zásaditou vodu měla méně metastazujících lézí. U skupiny užívající ionizovanou zásaditou voda bylo nalezeno 145 černých kolonií a u skupiny bez ionizované zásadité vody 257, což indikuje 44% útlum.

Dále byla měřena koncentrace ROS pro každý orgán u myši infikovaných B16 melanomovými buňkami za použití DCFH-DA, jelikož melanomové buňky často vykazují zvýšený oxidační stres, což by mohlo urychlit vývoj metastáz. Množství ROS v plicích, játrech a ledvinách bylo velmi malé u myši užívajících ionizovanou zásaditou vodu na rozdíl od myši požívajících kohoutkovou vodu. Nicméně, slezina jakožto hlavní orgán pro imunitu, vykazovala velmi vysoké množství ROS u myši užívající ionizovanou zásaditou vodu, což ukazuje podpůrný účinek ionizované zásadité vody na imunitu.



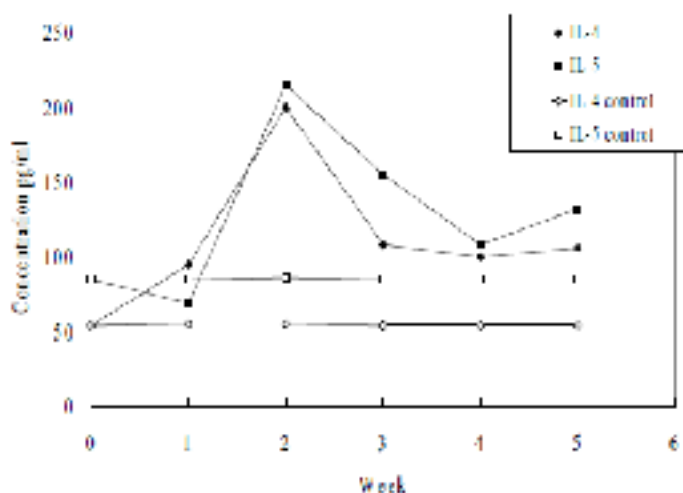
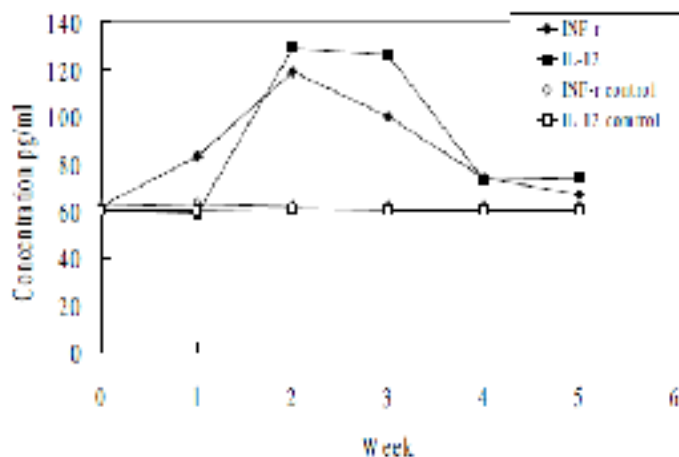
## Vyhodnocení imuno-modulačního efektu ionizované zásadité vody

Užívání ionizované zásadité vody zvýšilo systémové cytokiny, jako např. Th1 (IFN - gama, IL-12), cytokiny pro buněčnou imunitu a Th2 (IL-4, IL-5), cytokiny pro humorální imunitu. Takové výsledky dokazují, že ionizovaná zásaditá voda stimuluje jak buněčnou, tak humorální imunitu. Th1 a Th2 dosáhly maximálních výsledků po 2 týdnech užívání ionizované zásadité vody a poté se vrátily zpět na počáteční hodnotu. Hladina cytokinů u myši napájených kohoutkovou vodou zůstala na počátečních hodnotách.

**Obr 2. koncentrace Th1 a Th2 cytokinů v séru myši naočkovaných melanomovými buňkami :**

## DISKUZE

V nedávné době bylo prokázáno, že elektrolyticky redukováná voda s vysokým pH a významným negativně redukčním potenciálem má obdobný efekt jako super oxid dismutáza a kataláza, a chrání DNA proti poškození kyslíkovými radikály *in vitro*. Pokud ionizovaná zásaditá voda skutečně funguje



jako antioxidant a chrání DNA proti poškození, lze se domnívat, že užívání ionizované zásadité vody by mohlo mít protirakovinné účinky.

Tento výzkum prokazuje takovýto protirakovinný efekt ionizované zásadité vody. Užívání ionizované zásadité vody zpomalilo růst nádoru a utlumilo nitrožilní metastázy, což vedlo k prodloužení délky přežití u myši infikovaných B16 melanomem. B16 melanomové buňky jsou jedny z nejčastějších nádorových buněk u lidí a jsou známé pro svou vysokou schopnost invaze a metastáz<sup>6,7)</sup>. Jsou schopné vyhnout se imunitnímu dozoru a šířit se rychleji, než jakýkoli jiný nádor, za použití mechanismů jako například útlumu MHC prezentace antigenů či zvyšování hladiny ROS, a tak dochází k urychlení vývoje metastáz. Naše studie dokázala, že ionizovaná zásaditá voda funguje nejen jako antioxidant, ale i jako silný imuno-modulátor, což by oboje mohlo být zdrojem protirakovinného účinku. Proto by ionizovaná zásaditá voda mohla být účinná jak proti různým nemocem plynoucím z nízké imunity a/nebo z vysoké hladiny ROS, tak jako prevence rakoviny<sup>8)</sup>.

Ionizovaná zásaditá voda má nejen vysoké pH a nízký ORP, ale také obsahuje ionty magnezia. V nedávné době bylo prokázáno, že magnezium působí jako prevence různých nemocí<sup>8)</sup>. Nelze tedy vyloučit, že protirakovinný účinek ionizovaná zásaditá voda plyne právě z výskytu magnezia.

Voda se dostane do všech tkání lidského organismu 30 minut po vypití. Bez překážek se dostává i skrz krevně mozkovou bariéru do mozku a nemá téměř žádné vedlejší účinky. Užívání ionizované zásadité vody by mohla být ideální cesta k udržení zdraví.

1) Feig, D. I., Reid, T. M., and Loeb, L. A.: Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, *Cancer Res.*, **54**: 1890-1894, 1994.

2) Reid, T. M. and Loeb, L. A.: Mutagenic Specificity of Oxygen Radicals Produced by Human Leukemia Cells. *Cancer Res.*, **53**: 1082-1086, 1992.

3) Kim, H. W.: The Reason of Every Disease, Definition of Active Oxygen, "The Best Water for Human Body", 60-62, Seoul, Seojiwon press, 2002.

4) Shirahata, S., Kabayama, S., Nakano, M., Miura, T., Kusumoto, K., Gotoh, M., Hayashi, H., Otsubo, K., Morisawa, S., and Katakura, Y.: Electrolyzed-reduced Water Scavenges Active Oxygen Species and Protects DNA from Oxidative Damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**: 269-274, 1997.

5) Kim, S. H., H.J., C., Kang, D. H., Song, G. A., Cho, M., Yang, U. S., Kim, H. J., and Chung, H. Y. NF- $\kappa$ B binding activity and cyclooxygenase-2 expression in persistent CCL4-treated rat liver injury. *J Kor Med Sci*, **17**: 193-200, 2002.

6) Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Muijen, G. N., and Rüter, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol*, **115**: 337-344, 2000.

7) Shah, A. H., Tabayoyong, W. B., Kundu, S. D., Kim, S. J., Parijs, L. V., Liu, V. C., Kwon, E., Greenberg, N. M., and Lee, C. Suppression of tumor metastasis by blockade of transforming growth factor signaling in bone marrow cells through a retroviral-mediated. *Cancer Res*, **62**: 7135-7138, 2002.

8) Sander, C. S., Hamm, F., Elsner, P., and Thiele, J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, **148**: 913-922, 2003

Kontakt na autora:

Hyun-Won KIM, ph.D., Dept. of Biochemistry, Wonju College of Medicine, Yonsei Univ., Wonju 220-701, Korea. Phone +82-33-741-0283, Fax. +82-33-743-0411