

Działanie przeciwnowotworowe zredukowanej wody alkalicznej

Kyu-Jae LEE^{1,2}, Seung-Kyu PARK^{1,2}, Jae-Won KIM¹, Gwang-Young KIM¹,
Young-Suk RYANG⁵, Geun-Ha KIM¹, Hyun-Cheol CHO³, Soo-Kie KIM^{2,3} i Hyun-
Won KIM^{2,4}

¹ Wydział Parazytologii, ² Instytut Podstawowych Nauk Medycznych, ³ Wydział Mikrobiologii, ⁴ Wydział Biochemii, Wonju College of Medicine, Uniwersytet Yonsei (Wonju, Korea)

⁵ Wydział Biomedycznych Nauk Laboratoryjnych i Instytut Nauk o Zdrowiu, College of Health Science, Uniwersytet Yonsei (Wonju, Korea)

Abstrakt: Niektóre substancje mineralne po rozpuszczeniu w wodzie mogą wytwarzać zredukowaną wodę alkaliczną o wysokim pH i niskim potencjale oksydacyjno-redukcyjnym. Zredukowana woda alkaliczna wykazała istotne działanie przeciwnowotworowe. Po podskórnej i dootrzewnowej inokulacji komórek czerniaka B16, myszy C56BL/6 otrzymujące zredukowaną wodę alkaliczną wykazały opóźnienie wzrostu guza oraz znaczne wydłużenie czasu przeżycia. Po wstrzyknięciu do żyły ogonowej, zredukowana woda alkaliczna hamowała również w sposób istotny przerzuty poprzez zmniejszenie liczby kolonii czerniaka B16. Ilość reaktywnych form tlenu (RFT) znacznie się zmniejszyła po podaniu zredukowanej wody alkalicznej, z wyjątkiem śledziony, która jest istotnym narządem dla odporności. Nawet w przypadku zdrowych myszy, podaż zredukowanej wody alkalicznej wywołała cytokiny ogólnoustrojowe, takie jak Th1 (IFN- γ , IL-12) i Th2 (IL-4, IL-5), co sugeruje silne działanie immunomodulacyjne. Zarówno działanie wymiatające RFT jak i działanie immunomodulacyjne może być odpowiedzialne za przeciwnowotworowe działanie zredukowanej wody alkalicznej.

Słowa kluczowe: zredukowana woda alkaliczna, działanie przeciwnowotworowe, przeciwutleniacz, immunomodulacja

1. Wprowadzenie

Reaktywne formy tlenu (RFT), inaczej wolne rodniki, są jednym z głównych sprawców uszkodzenia oksydacyjnego makrocząsteczek biologicznych. Jest ogólnie wiadome, że te niestabilne RFT wywołują lub pogłębiają różne nieuleczalne choroby, takie jak rak, choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby neurodegeneracyjne, a także proces starzenia ^{1, 2}.

Komórkowe zmiatacze rodnikowe, takie jak dysmutaza nadtlenkowa, katalaza czy peroksydaza glutationowa stanowią naturalny system obronny przeciwko RFT. Zewnętrzne źródła ochrony antyoksydacyjnej obejmują witaminy antyoksydacyjne C i E, karoten i karotenoidy, jak również substancje mineralne takie jak selen i cynk. Wiele działań zostało podjętych w celu odkrycia bezpiecznych i silnych naturalnych przeciwutleniaczy.

Organizm człowieka składa się w 70% z wody. Woda dociera do każdej tkanki w organizmie człowieka w ciągu 30 minut od jej wypicia. Przechodzi również bez przeszkód przez barierę krew-mózg i nie ma prawie żadnych skutków ubocznych. Gdyby sama woda mogła działać jako zmiatacz wolnych rodników, byłaby idealnym przeciwutleniaczem ³.

Ostatnio wykazano, że poddana elektrolizie woda o wysokim pH i zdecydowanie ujemnym potencjale redoks posiada działanie podobne do dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, a zatem zmiata reaktywne formy tlenu i chroni DNA przed uszkodzeniem przez wolne rodniki in vitro ⁴.

Opracowaliśmy kombinację składników mineralnych w celu wytworzenie zredukowanej wody alkalicznej o wysokim pH i niskim potencjale redoks, podobną do wody elektrolizowanej. Kombinacja ta była łatwa do przenoszenia i tańsza niż system do produkcji wody elektrolizowanej.

Niniejszy artykuł prezentuje działanie przeciwnowotworowe zredukowanej wody alkalicznej w modelu zwierzęcym.

2. Materiał i metody

Zredukowana woda alkaliczna

Zredukowaną wodę alkaliczną otrzymano poprzez dodanie kombinacji składników mineralnych do butelki z wodą. Odczyn pH zwiększono do 10,5 a potencjał redoks obniżono do poziomu -200 mv. Zawartość składników mineralnych w zredukowanej wodzie alkalicznej była zwiększana w sposób zależny od czasu.

Zwierzęta i komórki

Myszy C57BL/6 (4-5-tygodniowe) pozyskano od Daehan Bio Link Co., Ltd. (Chungbuk, Korea) i trzymano na standardowej karmie i wodzie z kranu do momentu podawania zredukowanej wody alkalicznej. Linie komórkowe czerniaka mysiego B16 utrzymywano w pożywce Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) z dodatkiem 5% inaktywowanej temperaturą płodowej surowicy bydlęcej (FBS) w warunkach 95% wilgotności powietrza - 5% CO₂ w temp. 37°C. Wysoce metastatyczną linię komórkową B16 wyizolowano z płuca myszy C57BL/6, inokulowanych wewnątrztrzewnowo komórkami B16. Komórki sklonowano metodą ograniczonego rozcieńczania i wybrane klony inokulowano myszom. Czynność tę powtórzono trzykrotnie, gdzie końcowe klony o dużym potencjale przerzutowym otrzymano jako komórki czerniaka B16-BL6.

Ocena działania antymetastatycznego w warunkach in vivo

Wyhodowane komórki czerniaka B16-BL6 zebrano za pomocą 2 mM EDTA w roztworze PBS, a następnie trzykrotnie opłukano roztworem PBS. 1 × 10⁶ komórek czerniaka B16-BL6 wstrzyknięto do żyły ogonowej grupy kontrolnej oraz myszom C57BL/6 otrzymującym zredukowaną wodę alkaliczną. Po 20 dniach myszy uśmiercono, a płuca oceniono pod względem liczby kolonii komórek B16-BL6 ze zmianami przerzutowymi.

Hamowanie wzrostu guza w warunkach in vivo

Wyhodowane komórki czerniaka B16-BL6 zebrano za pomocą 2 mM EDTA w roztworze PBS, a następnie trzykrotnie opłukano roztworem PBS. 1 × 10⁶ komórek czerniaka B16-BL6 wstrzyknięto podskórnie na plecach myszy C57BL/6. Codziennie dokonywano pomiaru osi długiej i krótkiej guza, a objętość obliczano według wzoru $ab^2/2$, gdzie a to długość osi długiej, a b to długość osi krótkiej. Krzywą przeżycia przedstawiono z wykorzystaniem metody Kaplana-Meiera.

Oznaczenie cytokin metodą ELISA

Stężenie cytokin z surowic myszy oceniono za pomocą konwencjonalnej metody kanapkowej ELISA. Powłokę i biotynylowane przeciwciała wychwytyjące zakupiono od Pharmingen (USA): odpowiednio klony JES5-2A5 i JES5-16E3 dla IL-4 oraz klony R4-6A2 i XMG1-2 dla IL5. Powlekanie 96-dołkowej płytki do mikromiarczkowania wykonano z wykorzystaniem 250 g przeciwciał powłoki.

Kolejno dodano próbkę surowic, biotynylowane przeciwciało wychwytyjące, wtórne przeciwciało i streptawidynę HRP, następnie inkubowano i płukano. W celu rozwoju dodano roztwór o-fenylendiaminy, a w celu zatrzymania rozwoju kwas siarkowy 2N. Zmierzono absorbancję czytnikiem ELISA przy 490 nm.

Oznaczenie RFT

Zliczanie RFT w cytoplazmie przeprowadzono metodą oksydacji dioctanu 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF-DA) jak opisano w innym miejscu⁵). 12,5 M DCFDA inkubowano w homogenacie wątroby, śledziony, płuca lub mózgu, a zmianę fluorescencji mierzono przy długości fali wzbudzenia 485 nm i długości fali emisji 585 nm. Względną jednostkę fluorescencji ustalono na 1 mg białka w homogenacie.

3. Wyniki

Wpływ zredukowanej wody alkalicznej na wzrost guza oraz czas przeżycia

Wzrost guza został w znacznej mierze zahamowany w grupie otrzymującej zredukowaną wodę alkaliczną. Po 10 dniach od podskórnego wstrzyknięcia komórek czerniaka B16 w bok myszy C57BL/6, masa guza była wyczuwana palpacyjnie, a następnie regularnie mierzona. Po 10 dniach guz mierzył 0,27 cm³ w grupie otrzymującej zredukowaną wodę alkaliczną, natomiast w grupie otrzymującej wodę z kranu było to 0,48 cm³. Po 19 dniach guz mierzył 3,32 cm³ w grupie otrzymującej zredukowaną wodę alkaliczną oraz 6,02 cm³ w grupie kontrolnej wykazując 54% zahamowanie wzrostu.

Po wstrzyknięciu wewnątrztrzewnowym komórek czerniaka B16 myszom C57BL/6, monitorowano również wskaźnik przeżycia. Zredukowana woda alkaliczna przedłużyła średni czas przeżycia z 36 dni w grupie kontrolnej do 44 dni w grupie otrzymującej zredukowaną wodę alkaliczną.

Ocena działania antymetastatycznego zredukowanej wody alkalicznej na przerzuty B16 do płuc

Po dożylnym wstrzyknięciu komórek czerniaka B16 do żyły ogonowej myszy C57BL/6, oceniono działanie antymetastatyczne zredukowanej wody alkalicznej. 15 dni po iniekcji myszy zostały uśmiercone. Usunięto im tkanki płucne oraz porównano zmiany przerzutowe. Grupa otrzymująca zredukowaną wodę alkaliczną miała mniej zmian przerzutowych. W grupie otrzymującej zredukowaną wodę alkaliczną naliczono 257 czarnych kolonii na płucach, a w grupie kontrolnej odnotowano 145 czarnych plamek, wskazując na 44% hamowanie przerzutów komórek czerniaka.

Ponieważ wiadomo, że komórka czerniaka wykazuje zwiększony stres oksydacyjny, który może wspierać powstawanie przerzutów, zmierzono również stężenie RFT dla każdego narządu tych samych myszy, którym wstrzyknięto czerniaka B16 z wykorzystaniem DCFH-DA (**Ryc. 1**). Ilość RFT dla płuca, wątroby i nerki była bardzo mała u myszy otrzymujących zredukowaną wodę alkaliczną w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednak śledziona, która jest narządem istotnym dla odporności, wykazała wysoki poziom RFT w grupie otrzymującej zredukowaną wodę organiczną. Może to sugerować działanie wody wspierające odporność.

RFT (RFU/mg białka)

Wątroba

Wątroba

Nerka
Śledziona

Ryc.1. Wpływ zredukowanej wody alkalicznej na wymiatanie RFT u myszy.

Ocena działania immunomodulacyjnego zredukowanej wody alkalicznej

Podaż zredukowanej wody alkalicznej wywołała cytokiny ogólnoustrojowe, takie jak Th1 (IFN- γ , IL-12), cytokiny odporności komórkowej i Th2 (IL-4, IL-5), cytokiny odporności humoralnej (**Ryc. 2**). Sugeruje to, że zredukowana woda alkaliczna stymuluje zarówno odporność komórkową jak i humoralną. Th1 i Th2 osiągnęły wartość szczytową po 2 tygodniach podawania zredukowanej wody alkalicznej i powróciły do wartości początkowej. Stężenia cytokin w grupie otrzymującej wodę z kranu pozostały na poziomie wartości początkowych.

Stężenie pg/ml

INF-r

IL-12

INF-r kontrola

IL-12 kontrola

Tydzień

Stężenie pg/ml

IL-4

IL-5

IL-4 kontrola

IL-5 kontrola

Tydzień

Ryc.2. Kinetyka względem czasu w stężeniu cytokin Th1 i Th2 w surowicy w grupie myszy otrzymujących zredukowaną wodę alkaliczną i w grupie kontrolnej, którym wstrzyknięto komórki czerniaka B16-BL6

4. Dyskusja

Ostatnio wykazano, że poddana elektrolizie woda o wysokim pH i zdecydowanie ujemnym potencjale redoks posiada działanie podobne do dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, a zatem zmiata RFT i chroni DNA przed uszkodzeniem przez wolne rodniki in vitro. Jeśli zredukowana woda alkaliczna rzeczywiście działa jak przeciwutleniacz i chroni DNA przed uszkodzeniem, można postawić hipotezę, że jej podaż może wywoływać działanie przeciwnowotworowe.

Niniejsze badanie wykazuje przeciwnowotworowe działanie zredukowanej wody alkalicznej. Przyjmowanie zredukowanej wody alkalicznej spowalniało wzrost guza oraz hamowało przerzuty przy podaniu dożylnym, prowadząc do wydłużenia czasu przeżycia myszy, którym wstrzyknięto czerniaka B16. Komórka czerniaka B16 jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u człowieka i charakteryzuje się wysoką zdolnością inwazji i przerzutów^{6, 7}. Nowotwór ten wymyka się z pod kontroli układu odpornościowego i rozprzestrzenia się szybciej niż jakikolwiek inny guz opierając się na różnych mechanizmach, takich jak regulacja w dół MHC, podwyższenie stężenia reaktywnych form tlenu (RFT), a tym samym przyspieszenie powstawania przerzutów⁸). Nasze badanie wykazało nie tylko działanie zredukowanej wody alkalicznej jako przeciwutleniacza, ale także jako silnego

immunomodulatora, gdzie obydwie te role mogą odpowiadać za działanie przeciwnowotworowe. A zatem, zredukowana woda alkaliczna powinna być skuteczna w różnych chorobach wynikających z niskiej odporności i/lub wysokiego stężenia reaktywnych form tlenu, a także w zapobieganiu nowotworom.

Zredukowana woda alkaliczna posiada nie tylko wysokie pH i niski potencjał redoks, ale także jony magnezu. Ostatnio wykazano, że magnez jest skuteczny w zapobieganiu różnym chorobom⁸⁾. Nie możemy wykluczyć możliwości, że obecność magnezu w zredukowanej wodzie alkalicznej przyczyniła się do działania przeciwnowotworowego.

Woda dociera do każdej tkanki w organizmie człowieka w ciągu 30 minut od jej wypicia. Przechodzi również bez przeszkód przez barierę krew-mózg i nie ma prawie żadnych skutków ubocznych. Przyjmowanie zredukowanej wody alkalicznej może być idealnym sposobem na zachowanie zdrowia.

Piśmiennictwo

- 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- κ 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 Ruitter, 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

Dr Hyun-Won KIM, Wydział Biochemii,
Wonju College of Medicine,
Uniwersytet Yonsei, Wonju 220-701, Korea.
Tel. +82-33-741-0283, Faks +82-33-743-0411
E-mail kimhwbio@wonju.yonsei.ac.kr