

# Противоопухолевое действие щелочной восстановленной воды

Kyu-Jae LEE™, Seung-Kyu PARK™, Jae-Won KIM! , Gwang-Young KIM', Young-Suk RYANG®, Geun-Ha

4 Отдел паразитологии, ? Институт фундаментальных медицинских наук, 3  
Отделение микробиологии, \* Отделение биохимии,

Медицинский колледж Вонджу, Университет Йонсей. ( Вонджу , Корея)

\*Отдел биомедицинских лабораторных наук и Институт медицинских наук, Колледж  
медицинских наук, Университет Йонсей. ( Вонджу , Корея)

Аннотация: щелочную восстановленную воду производят с помощью ионизаторов воды с высоким рН и низким окислительно-восстановительным эффектом. потенциал (ОВП). Щелочная восстановленная вода (ГРУБАЯ) показала значительный противоопухолевый эффект. Когда клетки меланомы B16 инокулировали подкожно и внутрибрюшинно, мышей C56BL/6 кормили ГРУБЫЙ показал задержку роста опухоли, и продолжительность жизни была значительно увеличена. ROUGH также показал ингибирование метастазирования путем уменьшения количества колоний меланомы B16 при инъекции через хвостовую вену.

Количество активных форм кислорода (АФК) было очень снижено при кормлении ГРУБОЙ пищей, за исключением селезенки, который является основным органом иммунитета. Даже у нормальных мышей ГРУБОЕ потребление вызывало системные цитокины, такие как  $tnf$ , Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) и Th2 (IL-4, IL-5), что свидетельствует о сильном иммуномодулирующем эффекте. Как эффект продувки АФК, так и эффект иммуномодуляции могут быть ответственны за противоопухолевый эффект щелочной воды с отрицательным ОВП .

Ключевое слово: щелочная восстановленная вода, противоопухолевый эффект, антиоксидант, иммуномодуляция

## 1. Введение

Активные формы кислорода (АФК) или свободные радикалы являются одними из основных нарушителей окислительного повреждения биологических макромолекул. Эти нестабильные АФК известно, что они вызывают или усугубляют различные неизлечимые заболевания, такие как рак, сердечно - сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, а **также старение !**".

Клеточные радиальные поглотители, такие как супероксид дисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, являются естественной системой защиты от АФК. Внешние источники антиоксидантной защиты включают антиоксидантные витамины С и Е, каротин и каротиноиды, а также минералы, такие как селен и цинк. Большие усилия были приложены в попытке найти безопасные и мощные природные антиоксиданты.

Человеческое тело на 85-70% в зависимости от возраста состоит из воды. Вода достигает каждая ткань человеческого тела в течение 30 минут после питья. Он даже протекает через гематоэнцефалический барьер без каких-либо препятствий и почти не имеет побочных эффектов. Если бы сама вода могла работать как поглотитель радикалов, она была бы идеальным антиоксидантом \*).

Недавно было показано, что электролизованная восстановленная вода с высоким pH и значительным отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП) обладает дерноподобной активностью и каталазоподобной активностью и, таким образом, поглощает активные формы кислорода и защищает ДНК от повреждения кислородными радикалами *in vitro* ”.

Мы разработали минеральную комбинацию для получения щелочной восстановленной воды (ГРУБОЙ) с высоким pH и низким ОВП аналогичен электролизно-восстановленной воде. Минеральная комбинация была легка в переноске и дешевле, чем система получения электролизованной воды.

В настоящей статье показано противоопухолевое действие щелочной восстановленной воды на животной модели.

**Хен Вон КИМ, доктор философии, Кафедра биохимии, Медицинский колледж Вонджу, Университет Йонсей, Вонджу 220-701, Корея,**

## **2, Материалы и методы**

Щелочная Восстановленная вода (ARW)

pH воды был увеличен до 10,5 и ОРП был снижен до -200мв. Минеральное содержание ARW также увеличивалось в зависимости от времени.

Животные и клетки

Мыши C57BL/6 (возраст 4-5 недель) были получены от компании Daehan Bio Link Co., Ltd. (Chungbuk, Корея), и выдерживается на стандартной чау-чау и водопроводной воде до принятия

АРВ. Клеточные линии меланомы мыши В16 были сохранены в модифицированной среде

Орла- Дульбекко (DMEM)дополняется 5% термоинактивированной фетальной бычьей

сывороткой (FBS) в увлажненной атмосфере 95% воздуха-5% CO<sub>2</sub>, при 37°C.

Высокометастатическая клеточная линия В16 была выделена из легкого мыши C57BL/6, которая была инокулирована внутрибрюшинно клетками В16. Клетки клонировали методами предельного разведения, а отобранные клонированные клетки инокулировали мышам. Этот метод был повторен трижды, и окончательный клон с высоким метастатическим потенциалом был получен в виде клеток меланомы В16-ВL6.

В естественных условиях оценка влияния Антиметастатическим

Культированные клетки меланомы В16-ВL6 собирали с 2 мм ЭДТА в PBS, а затем трижды промывали PBS. клетки меланомы  $1 \times 10^6$  В16-ВL6 внутривенно вводили в хвостовую вену

контрольных и APB -введенных мышей C57BL/6. Через 20 дней мышей приносили в жертву, а легкие собирали для подсчета колоний метастазированных клеток меланомы B16-BL6.

В подавлении естественных условиях опухолевого роста Культивированные клетки меланомы B16-BL6 собирали с 2 мм ЭДТА в PBS, затем трижды промывали PBS.  $1 \times 10^6$  Клетки меланомы B16-BL6 подкожно вводили на спину мыши C57BL/6. Каждый день измеряли длину длинной и короткой оси опухоли и рассчитывали объемы по формуле  $ab^2/2$ , где а-длина длинной оси, а b-длина короткой оси. Кривая выживаемости строилась по методу Каплана-Мейера.

#### ИФА цитокинов

Концентрации цитокинов в сыворотках мышей измеряли обычным методом сэндвич-ИФА. Покрытие и биотинилированное захватное антитело были приобретены в форме Pharmingen (США): клоны JES5-2A5 и JES5- 163 для IL-4 и клонов R4-6A2 и XMG1-2 для ILS соответственно. Покрытие на 96-луночный планшет был выполняется с 250 г покрытия антителом. Образец сыворотки, биотинилированное захватное антитело, вторичное антитело, а затем стрептавидинилированный HRP последовательно добавляли, инкубировали и промывали. для разработки был добавлен раствор о-фенилендиамина и 2N серная кислота для остановки разработки. Поглощение при 490 нм измеряли с помощью считывателя ELISA при 490 нм.

#### Анализ АФК

Количественное содержание цитозольных АФК определяли методом окисления 2°,7'-дихлорфтороскеин-диацетата (DCF-DA), как описано в другом месте". 12,5 M DCFDA инкубировали с гомогенатом печени, селезенки, легких или головного мозга и измеряли изменение флуоресценции при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны излучения 585нм. Относительную единицу флуоресценции (РФУ) рассчитывали на 1 мг белка в гомогенате.

### 3. Результаты

#### Влияние APB на рост опухоли и время выживания

Рост опухоли был значительно снижен в группе APB-фэд. Через 10 дней после подкожного введения Клетки меланомы B16 вводили во фланг мышей C57BL/6, массу опухоли пальпировали и затем последовательно измеряли. Через 10 дней размер опухоли составил 0,27 см<sup>2</sup> для группы, питаемой APB , в то время как для группы, обработанной водопроводной водой, она составляла 0,48 см<sup>2</sup>. На19-е сутки размер опухоли составил 3,32 см<sup>2</sup> для ARW fed group и 6,02 см<sup>2</sup> для контрольной группы показано 54% - ное ингибирование.

Выживаемость также контролировалась после внутрибрюшинной инъекции клеток меланомы B16 мышам C57BL/6. APB удлинила среднее время выживаемости с 36 дней в контрольной группе до 44 дней в группе кормления APB.

#### Оценка антиметастатической активности APB

при метастазировании B16 в легкие После внутривенного введения клеток меланомы B16 мышам C57BL/6 через хвостовую вену оценивали антиметастатическую активность APB. Через 15 дней после инъекции мышей приносили в жертву. У них удаляли легочные ткани и

сравнивали метастатические поражения. В группе APB-ФЭД метастатических поражений было меньше. На легких группы ARW насчитали 257 черных колоний и 145 черных пятен. Были показаны в контрольной группе, указывая на 44% ингибирование метастазирования клеток меланомы.

Поскольку известно, что клетка меланомы проявляет повышенный окислительный стресс, который может поддерживать прогрессирование метастазирования, концентрацию АФК также измеряли для каждого органа одной и той же меланомы B16, введенной мышам с использованием DCFH-DA (рис. 1). Количество АФК для легких, печени и почек было очень низким у мышей, получавших APB -терапию, по сравнению с контролем. Однако селезенка, которая является основным органом иммунитета, показывает очень высокий уровень АФК в крови. Группа ПНС ФРС. Это может свидетельствовать об иммуностимулирующем эффекте APB.

## Обсуждение

Недавно было показано, что электролизованная восстановленная вода с высоким pH и значительным отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом обладают дерноподобной активностью и каталазоподобной активностью, а значит, очищают АФК и защищают ДНК от повреждения кислородными радикалами *in vitro*. Если APB действительно действует как антиоксидант и защищает ДНК от повреждений, можно предположить, что прием APB может показать противоопухолевый эффект.

Настоящее исследование демонстрирует противоопухолевый эффект APB. Прием APB замедлял рост опухоли и ингибировал внутривенное метастазирование, что приводило к увеличению продолжительности жизни мышей, которым вводили меланому B16.

Клетка меланомы B16 является одной из наиболее частых опухолей у людей и характеризуется высокой способностью к инвазии и метастазирования<sup>®</sup>. Они ускользают от иммунного надзора и распространяются быстрее, чем любые другие опухоли, используя несколько механизмов, включая пониженную регуляцию МНС, увеличивая количество активных форм кислорода (АФК) уровней и, таким образом, ускоряют прогрессирование метастазирования<sup>®</sup>).

Наше исследование показало, что APB действует не только как антиоксидант, но и как сильный иммуномодулятор, который может быть ответственен за противоопухолевый эффект. Таким образом, ожидается, что APB будет эффективен при различных заболеваниях, вызванных низким иммунитетом и/или высокими активными формами кислорода, а также для профилактики рака. ARW не только имеет высокий pH и низкий ОВП, но и содержит некоторое количество ионов магния. Недавно было доказано, что магний эффективен для профилактики различных заболеваний". Мы не можем исключить возможность того, что магний в APB мог способствовать противоопухолевому эффекту.

Вода достигает каждой ткани человеческого тела в течение 30 минут после питья. Он даже протекает через гематоэнцефалический барьер без каких-либо препятствий и почти не имеет побочных эффектов. Прием APB может быть идеальным способом поддержания здоровья.

## Рекомендации

- 1) Фейга, Д. Я, Рид, Т. М., и Леб, Л. А.: активные формы кислорода  
Видов опухолей, рак рез., 54: 1890-1894,  
1994,
- 2) Reid, T. M. and Loeb, L. A.: Мутагенная специфичность  
кислородных радикалов, продуцируемых лейкозными клетками человека.  
Исследование Рака, 53: 1082-1086, 1992.
- 3) Ким, Х. У.: Причина каждой болезни, Определение  
Активного кислорода, "Лучшая вода для человеческого организма", 60-62,  
Сеул, Seojiwon press, 2002.
- 4) Сирахата, С., Кабаяма, С., Накано, М., Миура, Т.,  
Кусумото, К., Гото, М., Хаяси, Х., Оцубо, К.,  
Морисава, С. и Катакура, Ё.: Электролизно-восстановленная вода  
Поглощает Активные формы кислорода и защищает ДНК от  
Окислительные повреждения. Біохім.журн. Биофиз. Res. Коммуна, 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-kB связывающая  
активность и экспрессия циклооксигеназы-2 в персистентных  
ССЛ4-обработанное повреждение печени крыс. J Kor Med Sci, 17: 193-200,  
2002.
- 6) Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Muijen, G. N., and  
Ruiter, D. J. Матриксные металлопротеиназы при меланоме человека,  
J Invest Dermatol, 115: 337-344, 2000.
- 7) Шах, А. Х., Табаюн, У. Б., Кунду, П. Д., Ким, С. Тис  
Париже, Л. В., Лю, В. С., Квон, Е., Гринберг Н. м.,