
THE IMPACT OF IONIZED WATER SUPPLEMENTED WITH GLUTATHION AND VITAMIN C DURING ACUTE HYPERTHERMIC EXPOSURE ON THE CONCENTRATION OF TOTAL PROTEINS IN THE BLOOD SERUM AT WHITE LABORATORY RATS**Majlinda Ademi**

Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University - Stip, R. of N.Macedonia,

majlindaademi@live.com**Icko Gjorgoski**

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Institute of Biology, Ss. Cyril and Methodius University -

Skopje, R. of N. Macedonia, icko.gjorgoski@gmail.com**Ilbert Ademi**

General City Hospital Ferid Murad, Department of surgery with urology – Gostivar R. of N. Macedonia,

ylberademi@live.com

Abstract: Alkaline water is in the focus of scientific interest over the last decade, due to its ability to alkalinize the organism as well as its antioxidant effect. The aim of our research is to determine the impact of ionized water by adding enzymatic and non-enzymatic antioxidants, glutathione and vitamin C, during hyperthermic stress, on the concentration of total proteins. The experiment performed on a white laboratory Wistar rats, a female sex, weighing 180-220 g, young rats, divided into three groups of 15 individuals. Oxidative stress was caused by acute hyperthermic exposure at 41°C. The first group is the control group (KPM), the second group is treated with ionized water (TAM), and the third group with ionized water with added glutathione and vitamin C (TAD). The duration of treatment lasted 21 days. Acute hyperthermic exposure caused a significant difference in total protein concentration between the 7th and 14th day taken as the starting points and the 21st day of treatment, respectively, on the day of hyperthermic exposure of rats. Such a significant difference was observed in the KPM and the TAM group ($p < 0.001$), whereas the TAD group is an exception where no statistically significant difference was observed in the same period ($p > 0.05$). Animals treated with ionized water on day 14 showed a significantly higher total protein concentration ($p < 0.01$) compared to the group receiving only natural water, which is consistent with the finding obtained by comparison between the KPM and TAD group at 21st day where the difference is also statistically significant ($p < 0.05$). The acute application of the treatment with ionized water, without or in combination with other antioxidants, in the absence of hyperthermic stress does not lead to a significant alteration in protein concentration. The hyperthermic exposure intensifies the production of oxygen radicals and the potential for oxidative modification of proteins and molecules with a protein structure. Individual action of ionized water as well as synergism with the added antioxidants caused a high protective effect on oxidative damage. Because of this, the effect of oxidative cleavage is less pronounced in rats treated with ionized water and antioxidants because they have a stronger antioxidant defense that prevents oxidative modification of proteins and all biomolecules in the body.

Keywords: Ionized water, hyperthermic stress, glutathione, total proteins

ВЛИЈАНИЕТО НА ЈОНИЗИРАНАТА ВОДА ОБОГАТЕНА СО ГЛУТАТИОН И ВИТАМИН С ПРИ АКУТНА ХИПЕРТЕРМИЧКА ЕКСПОЗИЦИЈА ВРЗ КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА ВКУПНИТЕ ПРОТЕИНИ ВО КРВНИОТ СЕРУМ КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИЈСКИ СТАОРЕЦ**Мајлинда Адеми**

Факултет за Медицински науки, Универзитет “Гоце Делчев” – Штип, Р.С.Македонија,

majlindaademi@live.com**Ичко Ѓорѓоски**

Природно-математички факултет, Институт за биологија, Универзитет “Св.Кирил и Методиј”,

Скопје, Р.С.Македонија, icko.gjorgoski@gmail.com**Илберт Адеми**

Општа болница “Ферид Мурад”, Хируршко одделение со урологија, Гостивар, Р.С. Македонија,

ylberademi@live.com

Резиме: Јонизираната вода е во фокусот на научниот интерес во последниве десетина години, заради нејзината способност за алкализација на човечкиот организам, како и заради нејзиниот антиоксидациски ефект. Целта на нашето истражување е да го утврдиме влијанието на јонизираната вода со додавање на ензимски и неензимски антиоксиданси, глутатион и витамин С, при хипертермички стрес, врз концентрацијата на вкупните протеини. Експериментот беше изведен врз бели лабораторијски стаорци од сојот Wistar, женски пол, со тежина 180-220 гр., млади стаорци, поделени во три групи по 15 единки. Оксидативниот стрес беше предизвикан со акутна хипертермичка експозиција на 41°C. Првата група е контролна група (КПМ), втората група е третирана со јонизирана вода (ТАМ), а третата група со јонизирана вода со додаден глутатион и витамин С (ТАД). Времетраењето на третманот траеше 21 ден. Акутната хипертермичка експозиција предизвика значајна разлика во концентрацијата на вкупни протеини помеѓу 7-ми и 14-ти ден земени како појдовни точки и 21-от ден од третманот односно денот на хипертермичко експонирање на стаорците. Ваквата значајна разлика се регистрира кај КПМ и кај ТАМ групата ($p < 0.001$), додека ТАД групата е исклучок каде во истиот период не се забележува статистички значајна разлика ($p > 0.05$). Третираните животни со јонизирана вода на 14-ти ден покажаа значајно повисока концентрација на вкупни протеини ($p < 0.01$) во споредба со групата која примала само природна вода, што е во согласност со констатацијата добиена при компарација направена помеѓу КПМ и ТАД групата на 21-ви ден каде разликата е исто така статистички значајна ($p < 0.05$). Акутната апликација на третманот со јонизирана вода, без или во комбинација со други антиоксиданти, во периодот кога отсутува хипертермичкиот стрес не доведува до значајна алтерација во концентрацијата на протеини. Хипертермичката експозиција ја интензивира продукцијата на кислородни радикали и можноста за оксидативна модификација на протеините и молекулите со протеинска структура. Индивидуалното делување на јонизираната вода како и синергизмот со додадените антиоксиданти условил висок протективен ефект врз оксидативното оштетување. Поради ова, ефектот на оксидативно цепање е помалку изразен кај стаорците третиран со јонизирана вода и антиоксиданти бидејќи кај нив има посилна антиоксидативна одбрана која ги превенира од оксидативна модификација протеините и сите биомолекули во организмот.

Клучни зборови: јонизирана вода, хипертермички стрес, глутатион, вкупни протеини

ВОВЕД

Зголемување на температурата во амбиенталната средина во која престојуваат организмите, а која доведува до метаболичка активација комбинирана со покачена консумпција на кислород, иницира состојба на т.н. оксидативен стрес (Halliwell, & Gutteridge, 1989). Слободните кислородни радикали (ROS) кои се токсични за клетката може да се продуцираат и при хипертермија. Како одговор на овие проблеми, клетките изложени на топлотен шок ја зголемуваат антиоксидативната одбрана, посебно активноста на антиоксидативните ензими (Hermes-Lima, M., 2004). Меѓу реакциите кои се јавуваат при престој во средини со висока надворешна температура посебно место завземаат: покачувањето на телесната температура, промена на кожната циркулација и загуба на телесната маса, промена на лимфоидните клетки и лимфоидните органи т.е. имуниот систем (Gjorgoski, I., и сор. 2008). Природниот антиоксидативен систем се состои од серија на антиоксидантни ензими, како и бројни ендогени антиоксидантни состојки кои се способни за и со инактивирање на ROS (Vaziri, N. D., и сор., 2003) Најчесто користени и темелно експериментално проучувани неензимски антиоксиданти се витамините, односно аскорбинската киселина, токоферолот и β -каротин. Освен што служат во директна детоксикација на слободните радикали, тие исто така комуницираат во процесите на рециклирање за да генерираат редуцирани форми на витамини (Reiter, R. J., и сор., 2000). Глутатионот е силен редуцирачки агенс кој може директно да ги неутрализира водородните и липидните радикали. Ваквата редуцирачка способност на GSH е асоцирана со формирање на -GS радикал кој доколку не се инактивира ефикасно (на пример со аскорбат), може да доведе до прооксидативни реакции (Włodek, L., 2002). Витамин С е моќен не-ензимски антиоксидант, способен да реагира со широк спектар на биолошки оксиданти и истиот го инхибира создавањето на липидна и протеинска пероксидација (Carr, & Frei, 1999) и консеквентното ДНК оштетување (Fraga, C. G., и сор., 1991). Јонизирана или редуцирана вода претставува елетрохемиски активирани вода со рН вредност поголема од 7. Според релативно поновите трудови (Guyton, & Hall, 2005) електрохемиски редуцираната вода (ERW) поседува алкална рН вредност во интервалот од 8 до 10, има негативен стандарден редокс потенцијал и е богата со редуцирани водородни формации од видот на молекуларен водород, водородни атоми и метални хидриди. Поради присуството на редуцирачки својства, ERW покажува значителна активност во елиминирањето на реактивните кислородни радикали со кои доаѓа во контакт, како што се хидрокси радикалот, пероксидните радикали, па и некои супероксидни честички (Ye, J., и сор., 2008). Очигледно е дека електрохемиската активација резултира со

алкализација (зголемување) на pH вредноста на сите води. Уште поважно е што електрохемискиот потенцијал се намалува, а во некои случаи добива и високо негативна вредност, што укажува на високиот антиоксидациски потенцијал на соодветната вода. Да спомнеме дека високиот негативен електрохемиски потенцијал е во корелација со антиоксидациската способност на активираната вода, а оттука и нејзиниот потенцијал за позитивно влијание врз човечкото здравје (Mircevski, V., 2016). Оксидацијата на протеините се дефинира како ковалентна модификација на молекулата, индуцирана директно од страна на ROS или индиректно преку реакција со секундарни продукти на оксидативниот стрес (Stadtman, & Levine, 2000). Најшироко проучуваната модификација на протеините предизвикана од оксидативниот стрес е формирање на карбонилни деривати (Finkel, & Holbrook, 2000).

ЦЕЛИ

Целите на нашето истражување произлегоа од нашите претпоставки дека преку конзумирање на јонизирана односно електрохемиски редуцирана вода (ERW) ќе се збогати алкалната резерва во организмот. Акцентот на ваквото својство на ERW го ставивме во услови на изложеност на организмот во услови на висока надворешна температура како стресоген фактор. Нашите очекувања беа базирани на податокот дека ERW преку своето делување како антиоксидант ќе ја зголеми ефикасноста во редуцирање на оксидативниот стрес и ќе ја засили термотолерантноста на самиот организам врз концентрацијата на протеините во серум кај бел лабораторијски стаорец.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Експериментален модел

Како експериментален модел беа користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar, од женски пол со телесна тежина од 180-220 грами, поделени во три групи (по 15 животни, $n=45$) за аплицирање на соодветен третман. За време на експериментот животните претстојуваша на собна температура 20 ± 2 °C, при светлосен режим 12:12 часа. На сите животни вклучени во експериментот им беше давана стандардна лабораториска храна и вода ad libitum.

Експерименталните групи од по 15 животни беа организирани и обележани на следниот начин:

1. Прва група животни (КПМ) – кои во текот на целиот експериментален период беа под горенаведените услови и во понатамошниот текст ќе бидат спомнувани како контролна група која ќе прима само вода.
2. Втора група животни (ТАД) - кои во текот на целиот експериментален период беа под горенаведените услови и беа третирани со јонизирана вода
3. Трета група животни (ТАМ) – одгледувани под истите експериментални услови и беа третирани со јонизирана вода обогатена со додатоци на глутатион и витамин С

Експериментален протокол

Трите групи на стаорци во експериментален период во времетраење од 21 ден, секојдневно во утринските часови беа третирани со соодветно модифицирана природна вода. Контролната група во наведениот период добиваше само природна вода. Двете останати групи, соодветно, примаа јонизирана вода (ERW, алкална вода) и јонизирана вода со додадени глутатион и витамин С во истата. Водата беше аплицирана интрагастрално во волумени од по 2 ml. Примероците за анализа на одбраните параметри беа земени на 7-ми, 14-ти и 21-ви ден од третманот. Потребната крв за анализа на 7-ми и 14-ти ден беше земена од опашката на стаорците и истата беше колекционирана во соодветно обележани епендорфи. Крвен серум за анализа се доби по 5 минути центрифугирање на 1500 грм и истиот беше замрзнат на -80 °C за потребните анализи. Пет часа по добивање на соодветниот третман на 21-ви ден, животните од соодветните групи беа изложени на хипертермна средина до постигнување на фаза на секундарна хипертермија (телесна температура од 43 °C). Експозицијата се изведуваше индивидуално во клима комори на 40 ± 1 °C во времетраење од 80 минути. За време на хипертермичката експозиција беше следена и ректалната температура.

Одредување на концентрација на вкупни протеини

Принцип на методот

Колориметрското одредување на вкупните протеини се базира на Биуретната метода. Азотните атоми инволвирани во пептидните врски на протеините во алкален медиум се врзуваат за Cu^{2+} јоните при што истите се редуцираат до Cu^{+} и се формира виолетов хелат. Интензитетот на виолетовото обојување апсорбирано на 540nm е пропорционално со концентрацијата на протеини во примерокот. Формирањето на Cu^{+} -протеинскиот комплекс бара присуство на најмалку две пептидни врски и затоа Биуретната метода е негативна за дипептидите кои содржат една пептидна врска. Lowry методот е модификација на Биуретната

метода со повисока сензитивност за детекција на пониски концентрации на протеини во примерок. Првиот чекор од Lowry методата е идентична со Биуретната метода додека во втората етапа се додава Folin-Ciocalteu оксидирачки агенс. Двете ароматични аминокиселини тирозин и триптофан, цистеинот и Cu^{+} јонот подлежат на оксидација и го редуцираат Folin реagensот до сино обојување чиј интензитет може да се прочита на бранова должина од 650-750nm..

Тест процедура

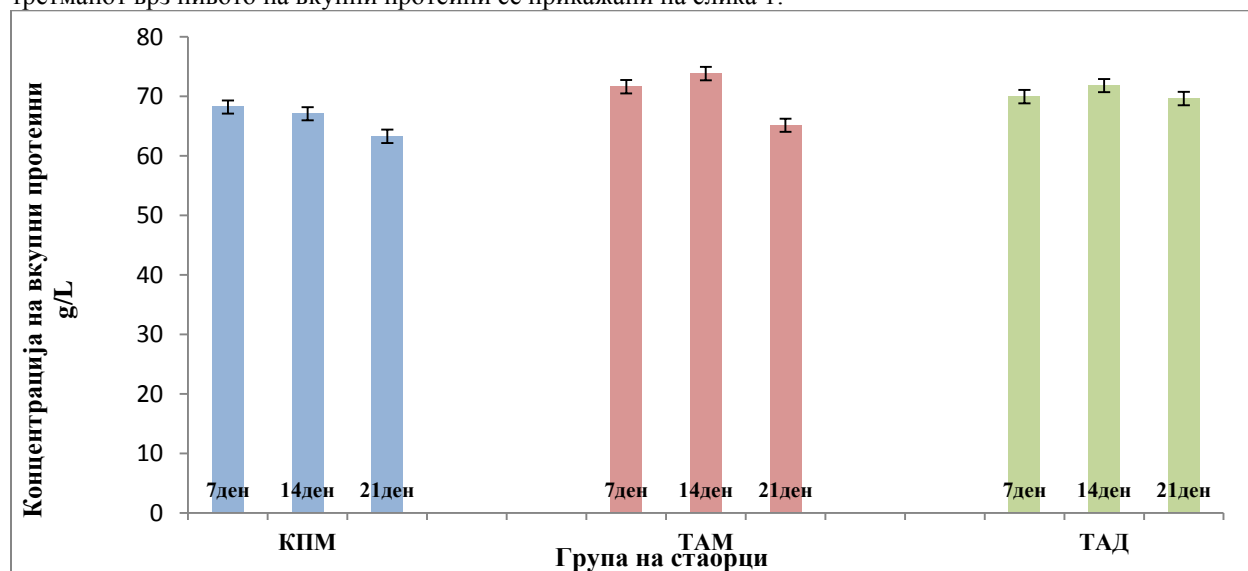
На порциите крвен серум се додава Биуретен раствор А (0,027% $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 2% Na_2CO_3 во 0,1 mol NaOH и кон тоа се додава 1 ml 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). По точно 10 минути се додава раствор В (Folin-Ciocalteu реagens, разреден 1:1 со дејонизирана вода). Интензитетот на обојување се мери на бранова должина од 660 nm. Како стандарден раствор се користи говедски серум албумин (BSA), од кој се прават серија на разредувања со цел да се формира стандардна крива.

Статистичка анализа

Статистичката обработка на добиени резултати во текот на експериментот беше извршена со статистичката програма InStat. Резултатите се претставени како средни вредности со стандардна грешка (SEM). Ефектот од индивидуалниот третман со алкална вода како и со додатоци на витамин С и GSH во истата во комбинација со хипертермичко изложување на експерименталниот модел беше утврден со примена на One-way analysis of variance (ANOVA). Присуството на статистички значајна разлика беше утврдено во рамките на поединечна група како и при споредба на комбинација од три дадени групи. Сигнификантноста на разликите при споредби во рамките на иста група стаорци, во функција на време, беше утврдена со Repeated measures ANOVA, додека при споредбите на различни групи животни беше искористена Ordinary ANOVA. Како сигнификантни промени беа забележани вредностите на $p < 0.001$.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од нашето истражувањето за влијанието на третманот со јонизирана вода, без и со додатоци на соодветните антиоксиданти во истата, како и акутната хипертермичка експозиција воведена на 21-от ден од третманот врз нивото на вкупни протеини се прикажани на слика 1.



Слика 1. Концентрација на вкупни протеини во крвен серум
Figure 1. Concentration of total protein in blood serum

Легенда: КПМ – контролна група третирана со природна вода; ТАМ – група третирана со јонизирана вода; ТАД – група третирана со јонизирана вода со додатоци на глутатион и витамин С

Табела 1. Резултати од статистичката анализа на податоците за концентрацијата на вкупни протеини во серум

Статистичка анализа – концентрација на вкупни протеини				
Споредувани групи			Резултат	
КПМ 7	vs	КПМ 14	p > 0.05	Ns
КПМ 7	vs	КПМ 21	p < 0.01	**
КПМ 14	vs	КПМ 21	p < 0.05	*
ТАМ 7	vs	ТАМ 14	p > 0.05	Ns
ТАМ 7	vs	ТАМ 21	p < 0.001	***
ТАМ 14	vs	ТАМ 21	p < 0.01	***
ТАД 7	vs	ТАД 14	p > 0.05	Ns
ТАД 7	vs	ТАД 21	p > 0.05	Ns
ТАД 14	vs	ТАД 21	p > 0.05	Ns
КПМ 7	vs	ТАМ 7	p > 0.05	Ns
КПМ 7	vs	ТАД 7	p > 0.05	Ns
ТАМ 7	vs	ТАД 7	p > 0.05	Ns
КПМ 14	vs	ТАМ 14	p < 0.01	**
КПМ 14	vs	ТАД 14	p > 0.05	Ns
ТАМ 14	vs	ТАД 14	p > 0.05	Ns
КПМ 21	vs	ТАМ 21	p > 0.05	Ns
КПМ 21	vs	ТАД 21	p < 0.05	*
ТАМ 21	vs	ТАД 21	p > 0.05	Ns

ДИСКУСИЈА

Истражувањата (Shirahata et al., 1997; Lee et al., 2006) го покажале супресивниот ефект на ERW врз протеинската деградација, односно врз оксидативната модификација на протеините и ензимите како биомолекули со протеинска структура. Нашето истражување, во временскиот период пред воведување на хипертермичкиот стрес, поточно од 7-ми до 14-ти ден, покажа незначајна разлика на вкупните протеини во крвниот серум кај животните третирани со јонизирана вода и јонизирана вода со додатоци на глутатион и витамин С, како и кај контролната група. На 21-ви ден од третманот кога воведовме хипертермички стрес, како причинител на оксидативен стрес кај стаорците, кај контролната и ТАМ групата констатираме статистички значајна пониска концентрација на протеини во однос на претходниот период на третман како резултат на високата концентрација на ROS кои интензивно оксидативно ги оштетуваат овие макромолекули. Претпоставуваме дека концентрација на вкупните протеини на ова ниво на експериментот, кога животните се подложени на силен хипертермички стрес кој предизвикал значајна елевација на оксидативниот стрес во организмот, би била уште пониска доколку отсуствува третманот со ERW кај групата третирана со истата. Степенот на оксидативно оштетување на протеините ќе зависи од јачината на антиоксидативната одбрана кај секоја група стаорци. Поради тоа, очекувано, кај ТАД групата нема значајно намалување на концентрацијата на вкупни протеини бидејќи третманот со обогатената алкална вода превенирал оксидација на истите. Веруваме дека и во нашата студија како кај гореспоменатите студии на Shirahata et al., 1997 и Lee et al., 2006 бил во функција веќе дискутираниот механизам за заштитниот ефект на ERW врз оксидативно цепење на протеините и нивната субсеквентна протеолитичка деградација. Иако ова наше констатирање е во согласност со одредени литературни истражувања, сепак не може безусловно да се спореди со нашите добиени резултати бидејќи разликата во концентрацијата на вкупни протеини меѓу КПМ групата на 21-ви ден и ТАМ групата на истиот ден е незначајна и покрај тоа што кај контролната група нема аплициран третман со ERW.

ЗАКЛУЧОК

Акутната апликација на третманот со јонизирана вода, без или во комбинација со други антиоксиданти, во периодот кога отсуствува хипертермичкиот стрес не доведува до значајна алтерација во концентрацијата на протеини. Хипертермичката експозиција ја интензивира продукцијата на кислородни радикали и можноста за оксидативна модификација на протеините и молекулите со протеинска структура. Индивидуалното делување на јонизираната вода како и синергизмот со додадените антиоксиданти условил висок протективен ефект врз оксидативното оштетување. Поради ова, ефектот на оксидативно цепење е помалку изразен кај

стаорците третирани со јонизирана вода и антиоксиданти бидејќи кај нив има посилна антиоксидативна одбрана која ги превенира од оксидативна модификација протеините и сите биомолекули во организмот.

ЛИТЕРАТУРА

- Carr, A. & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal*, 13(9), 1007–1024.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.*; 408(6809):239-47
- Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Shigenaga, M. K., Helbock, H. J., Jacob, R. A., & Ames, B.N. (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11003–11006.
- Gjorgoski, I., Spasov, M., Mladenov, M., Hadzi-Petrusev, N., Dimovska, J., Ovnarska, V., & Rtovski, D. (2008). Ефектот на високата надворешна температура во интраутериниот и раниот постнатален период врз масата протеините и нуклеинските киселини во тимусот кај белиот лабораториски стаорец. *Biol. Macedonica*, 59/60: 51-66
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2005). *Medical Physiology*, 11ed.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Clarendon Press.*; p. 543
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB, editor. *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley & Sons; New Jersey; pp. 319-368.
- Lee, M. Y., Kim, Y. K., Ryoo, K. K., Lee, Y. B., Park, E. J. (2006). Electrolyzed-reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135(2), 133–144.
- Mircevski, V. (2016). Srebrena i alkalna voda - institut za hemija PMF. Retrieved from https://ih.pmf.ukim.edu.mk/files/Attachment/Srebrena_i_alkalna_voda_2.pdf
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gitto, E. (2000). Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress. *J Biomed Sci*; vol.7:444–458
- Shirahata, S., Kabayama, S., Nakano, M., Miura, T., Kusumoto, K., Gotoh, M., Hayashi, H., Otsubo, K., Morisawa, S., Katakura, Y. (1997). Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234(1), 269–274.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *ANN N Y Acad. Sci.* 899, 191-208
- Vaziri, N. D., Dicus, M., Ho, N. D., Boroujerdi-Rad, L., & Sindhu, R. K. (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* Vol.63(1):179-85.
- Włodek, L. Beneficial and harmful effects of thiols. (2002). *Polish Journal of Pharmacology*, 54(3), 215–223.
- Ye, J. Li, Y., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Komatsu, T., Kashiwagi, T., Teruya, K., Nishikawa, R., Kawahara, T., Osada, K., Toh, K., Abe, M., Tian, H., Kabayama, S., Otsubo, K., Morisawa, S., Katakura, Y., & Shirahata, S. (2008). Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis. *Biol Pharm Bull.* 31(1):19-26.