

CONSIDERATIONS REGARDING THE EFFECTS OF ALKALINE WATER ON LIVING ORGANISMS

Oana GĂINARU*, Nicoleta IANOVICI

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

*Corresponding author e-mail: oana.gainaru99@e-uvv.ro

Received 19 May 2021; accepted 5 July 2021

ABSTRACT

Alkaline water has been a subject of interest ever since the late 1940s, when its use was popularized in Japan as treatment for gastrointestinal symptoms. Throughout the years, with its growing demand and accessibility worldwide, numerous studies have been conducted in order to determine the effects of alkaline water consumption on living organisms and on human health primarily. This review aims to observe the effects of alkaline water consumption that have been determined and explained in the scientific literature, compiling both studies realized in vitro and in vivo, on various test subjects and on humans directly. It has been concluded in numerous articles that while alkaline water manifested positive results on murine subjects, in both plants and humans, its presence either caused insignificant statistical differences, either induced negative effects on the organisms. As a result, additional studies on various aspects need to be conducted in the future in order to determine a definite conclusion.

KEYWORDS: *alkaline water, antioxidant properties, therapeutic properties, alkaline reduced water (ARW), electrolyzed alkaline reduced water (ERAW)*

1. Caracteristicile fizico-chimice, biologice și terapeutice ale apei alcaline
2. Proprietăți antioxidante ale apei alcaline
3. Dovezi experimentale pentru efectele antidiabetice ale apei alcaline
4. Dovezi experimentale pentru efectele anticancer ale apei alcaline
5. Cercetări experimentale privind efectele biologice ale NP
6. Cercetări experimentale privind proprietățile biologice și terapeutice ale dihidrogenului
7. Studii privind efectele ERAW
 - 7.1. Probleme gastro-intestinale
 - 7.2. Hemodializa cu ERAW
 - 7.3. Studii despre acțiunea terapeutică a apei reduse neutre îmbogățite în dihidrogen
 - 7.4. Studii despre acțiunea terapeutică a MSW
 - 7.5. Efecte sistemice și locale ale expunerii pe termen lung la apă alcalină de băut la șobolani
 - 7.6. Efectele apei alcalin ionizate asupra reproducerii șoarecilor
8. Efectele anti-îmbătrânire ale apei alcaline
9. Efectul pH-ului apei potabile asupra microbiotei intestinului și asupra reglării glucozei
10. Asocierea dintre dieta alcalină, apa alcalină și cancer
11. Efectul apei alcaline cu pH ridicat asupra vâscozității sângelui la adulții sănătoși
12. Mecanismul de acțiune al ARW

1. Caracteristicile fizico-chimice, biologice și terapeutice ale apei alcaline

Aparatele care electrolizează apa potabilă pentru uz casnic sunt disponibile de câțiva ani. Aceste mașini de electroliză produc apă acidă (EOAW, pentru apă acidă oxidată electrolizată) și apă alcalină, cunoscută uneori în mod greșit sub numele de apă ionizată (ERAW, apă alcalină redusă electrolizată). Apa acidă nu este adecvată consumului uman, dar este adecvată pentru îngrijirea și igiena personală a corpului. Apa alcalină, pe de altă parte, este potabilă și recomandată în literatura comercială și de marketing drept benefică în tratamentul problemelor gastro-intestinale, hipertensiunii, diabetului și cancerului.

Cu mai mult de cincizeci de ani în urmă, pe baza studiilor rusești efectuate în jurul anului 1920, oamenii de știință japonezi au dezvoltat cu succes un proces pe bază de apă care implică o procedură de electroliză ce consta dintr-un compartiment anodic și unul catodic separate printr-o membrană permeabilă pentru ioni, permițând astfel separarea și recuperarea conținutului individual. Machisu Suwa a fost cel care, în colaborare cu Synnhol Electronic Machinery Company, a dezvoltat primul echipament de electroliză pentru producerea apei ionizate alcaline numite Synnhol Liquid (Fig1). Ulterior, în colaborare cu profesorul Akiba de la Universitatea din Tokyo, a fost construită o mașină electronică Synnhol pentru aplicații agricole (Synnhol Electronic Agricultural Machine), utilizată pentru cultivarea orezului, dar și pentru creșterea animalelor.

În 1950, a fost creată Asociația de Cercetare în Științe Medicale Synnhol pentru a încuraja transferul de tehnologie al aplicațiilor agricole în sectorul medical și dezvoltarea ionizatoarelor de apă pentru uz casnic. Aparatul rezultat – Synnhol Electronic Manufacturing Apparatus – a fost aprobat în conformitate cu Legea afacerilor farmaceutice (Department of the Ministry of Health, Labour and Welfare, 1965) pentru tratamentul eficient al problemelor de stomac, cu condiția ca pH-ul final și concentrațiile de calciu să se potrivească cu conținutul mineral al apei de la robinet care variază în diferite regiuni ale Japoniei. Utilizarea apei oxidate, slab acide și a astringenților a fost rezervată igienei personale și curățării corpului. De atunci, apa pentru consum a fost numită apă alcalin ionizată.

Cu toate acestea, au fost exprimate critici puternice care puneau la îndoială validitatea unei practici care nu fusese supusă unei evaluări clinice controlate și pentru care efectele pe termen lung erau necunoscute. Mai mult, oamenii de știință au contestat această denumire a apei ionizate ca fiind inadecvată și fiind ceea ce este apa potabilă în mod natural, dar fără interferențe antropice. Din aceste motive, Ministerul Sănătății, Muncii și Bunăstării din Japonia a solicitat date științifice care garantează calitatea,

eficiența și securitatea apei ionizate. Această sarcină a fost asumată de profesorul Itokawa de la Departamentul Medical al Universității din Kyoto, care a condus un comitet de revizuire și a publicat un raport public în 1994 prin care confirmă siguranța apei ionizate. În 1999, la cel de-al 25-lea Congres General al Asociației Japoneze de Științe Medicale, raportul a fost prezentat sub titlul „*Electrolytic Functional Water in Medical Treatment*”. Acesta a subliniat concluziile primelor teste clinice dublu-orbe care stabilesc că apa ionizată este eficientă și utilă în tratamentul bolilor gastro-intestinale. În 2005, legislația privind vânzările de produse farmaceutice a fost revizuită, calificând ionizatoarele de apă drept echipamente medicale aprobate pentru uz casnic. Ministerul Sănătății, Muncii și Bunăstării a notificat (Notificarea nr. 112) faptul că aparatele pentru generarea apei potabile electrolizate alcaline sunt utile pentru îmbunătățirea simptomelor gastro-intestinale, cum ar fi diareea cronică, indigestia, activitatea anormală de fermentare intestinală și aciditatea stomacului (Department of the Ministry of Health, Labour and Welfare, 1992).

Astăzi, pe piață există mai multe tipuri de generatoare de apă ionizată mai mult sau mai puțin sofisticate. Majoritatea sunt fabricate în Japonia, dar mai recent, industria a dezvoltat și produse similare în Statele Unite, Canada și Australia. În medie, peste 200.000 de electrocasnice sunt vândute în fiecare an la nivel mondial la un preț care variază între 600 și 3000 €.

Apa alcalină este preponderant obținută cu ajutorul aparatelor de ionizare. Toate ionizatoarele de apă se conectează la rețeaua de alimentare cu apă potabilă. Apa este filtrată peste cel puțin un filtru de cărbune activ, esențial pentru reducerea nivelului de clorură al apei de la robinet și totodată, pentru evitarea deteriorării celulei electrolitice (Figura 1).

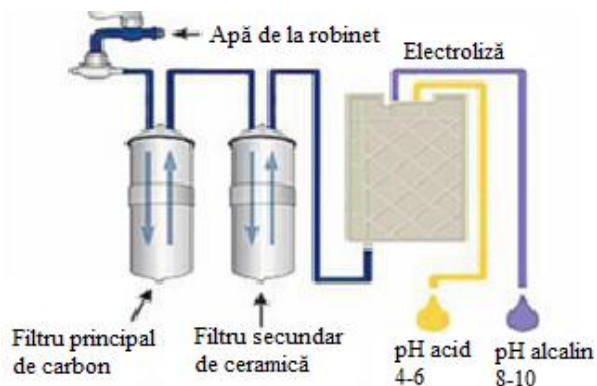
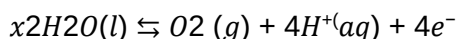
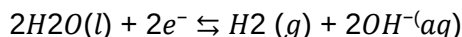


FIG. 1. Reprezentare schematică a unui aparat comercial de electroliză a apei (preluat după Henry și Chambron, 2013).

Apa filtrată trebuie să aibă un conținut minim de minerale de aproximativ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pentru a se supune electrolizei într-o cameră formată dintr-un anod și un catod, separate printr-o diafragmă semipermeabilă din plastic. Electrozii plați sau sub formă de plasă sunt fabricați din titan acoperit cu platină. Procesul de electroliză produce acid și apă oxidată la anod conform următoarei reacții:



Pe măsură ce electronii circulă prin circuitul electric, compartimentul anodului acumulează ioni minerali (HCO_3^- , Cl^- , HSO_4^- , NO_3^- etc.) și, pe măsură ce protonii și oxigenul sunt eliberați, apa capătă un pH între 4 și 6 și un potențial redox care ar putea ajunge la +900 mV. Totodată, apa alcalină redusă este produsă în compartimentul catodic datorită apariției următoarei reacții:



Aici, cationii minerali (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} etc.) se acumulează la catod și pe măsură ce se produc ioni hidroxil și hidrogen, apa își schimbă pH-ul la valori între 8 și 10 și se poate obține un potențial redox de până la -600 mV (Figura 2).

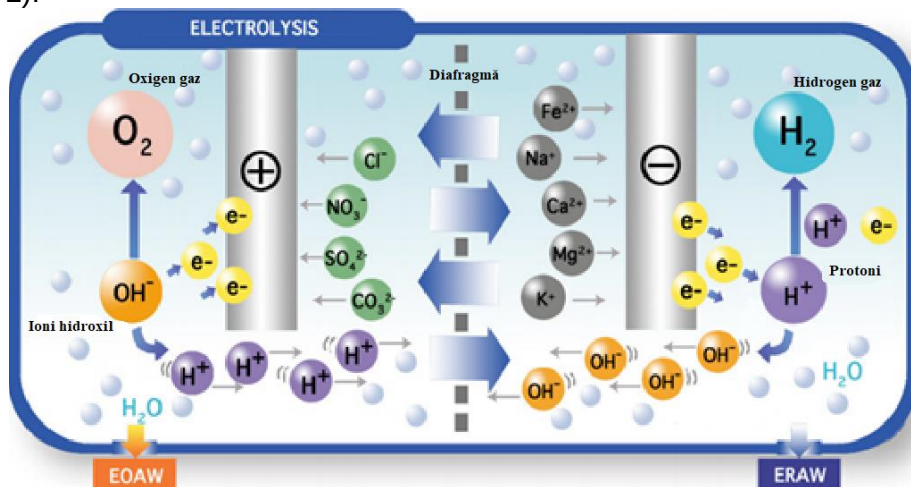


FIG. 2. Privire de ansamblu asupra unui generator comercial de apă electrolizată (preluat după Henry și Chambron, 2013).

Eficiența aparatului, pH-ului și a valorilor potențialelor redox obținute variază foarte mult, în funcție de caracteristicile sursei locale de apă, valorile de tensiune și curent, debitul de apă și temperatură. Se poate observa că efectul principal al electrolizei este reducerea semnificativă a valorii $r\text{H}_2$ a ERAW comparativ cu apa de la robinet originală, în timp ce valoarea pH-ului și rezistenței potențiale rămân relativ stabile. O comparație a acestor valori cu

cele ale apei minerale arată că apa ionizată este extrem de alcalină. Comparativ cu sursele de apă potabilă, ERAW prezintă valori ale pH-ului și rH_2 -ului rar întâlnite într-un mediu natural. Prin urmare, în mod normal, această apă ar trebui clasificată în aceeași categorie ca apele sintetice. În ceea ce privește rezistența ERAW, se pot găsi o gamă de valori de la 1600 la 1700 $\Omega \cdot \text{cm}$ care este stabilă în timp și rămâne în cadrul normei oficiale tolerate de 900-5000 $\Omega \cdot \text{cm}$. În ceea ce privește pH-ul, acesta poate varia de la 6,8 la 8,7 pentru acest tip de echipament și, de asemenea, rămâne relativ stabil în timp. În comparație, standardul de reglementare recomandă a pH-ului este cuprins între 6,5 și 9 pentru apa potabilă. Prin urmare, procedura de ionizare nu are ca rezultat valori anormale ale pH-ului. În ceea ce privește potențialul redox, valorile se încadrează în intervalul -654 până la +680 mV, cu o variație puternică în timp pentru potențialele de reducere negative și o stabilitate mai bună pentru potențialele pozitive de reducere. După corectarea efectului pH-ului, rH_2 (activitatea electronică) se găsește între 2 și 45, ceea ce înseamnă că acest tip de aparat poate produce în mod eficient apă cu un potențial oxidant extrem de ridicat sau dimpotrivă, un potențial reducător semnificativ.

Deoarece nu există un standard oficial privind potențialul redox sau rH_2 pentru apa potabilă, în prezent s-a creat o situație de mare incertitudine. În mediul natural, cele mai alcaline și anti-oxidante ape cunoscute se găsesc într-o peșteră de mină de ardezie cunoscută sub numele de Brandholz, în Germania, cu următoarele caracteristici: $T = 8-10^\circ \text{C}$, $\text{pH} = 8.01$, $E_h = -250 \text{ mV}$ ($rH_2 = 14.7$) corespunzătoare unei puteri electrochimice de $P = 0,003 \mu\text{W}$. A fost descoperită și apă cu atribute similare la Hita Tenryosui în Japonia, Tlacote în Mexic și Nadone în India, dar este totuși o apariție extrem de rară în natură. Toate aceste locuri sunt frecventate de mii de oameni care speră să-și vindece afecțiunile prin hidroterapie.

Lichidele biologice precum sângele, saliva sau urina sunt un alt exemplu unde potențialele redox naturale se întind pe o gamă cuprinsă între -50 și +150 mV, corespunzătoare unui rH_2 undeva între 20 și 26. Este clar însă că o parte din apa electrolizată produsă este complet anormală din punct de vedere biologic, justificând o evaluare clinică prealabilă înainte de orice utilizare terapeutică. Problema este, desigur, instabilitatea ERAW în timp, care trebuie consumată în ora ce urmează producției pentru a conserva nivelurile potențialului redox sau a rH_2 -ului. O altă preocupare importantă este aceea că apa cu niveluri ale pH-ului mai mari sau egale cu 8.24 și ale rH_2 mai mari sau egale 2,9 la $T = 17.7^\circ \text{C}$, dacă temperatura este ridicat la $22,4^\circ \text{C}$ cu ajutorul unui radiator, de exemplu, va prezenta o creștere a rH_2 până la 16,9 fără nicio modificare tangibilă a pH-ului (8.23). Prin urmare, este foarte probabil ca

ERAW, consumată și încălzită de corpul uman la temperatura corespunzătoare, să prezinte un potențial redox care va deveni din nou pozitiv.

De asemenea, nu există o normă oficial acceptată privind puterea electrochimică P care poate fi, de asemenea, extrem de variabilă. Cu toate acestea, acesta este cel mai interesant parametru deoarece combină trei proprietăți principale ale apei, și anume aciditatea/alcalinitatea, caracterul oxidativ/reducător și conținutul general de minerale. Puterea electrochimică a apei electrolizate poate varia de la 0 la 480 μW , ceea ce arată că este posibilă cu un singur aparat să se producă apă ionizată cu o putere electrochimică similară celor mai multe ape minerale naturale comerciale, în afară de St-Yorre (Tabelul 1).

Este de reținut faptul că, spre deosebire de apa minerală, puterea electrochimică nu este stabilă în timp și că apa cu proprietăți oxidative sau reducătoare poate avea o putere electrochimică echivalentă. Din perspectivă chimică, ERAW conține aceleași substanțe minerale dizolvate de bază precum apa utilizată la începutul procesului de electroliză, cât și o cantitate variabilă de dihidrogen dizolvat a cărui concentrație depinde de condițiile electrolizei și de nanoparticulele de platină (PtNPs) rezultate în urma degradării electrozilor, concentrația acestora depinzând de durata de utilizare a electrozilor.

TABEL 1. Caracteristici fizico-chimice ale unor ape minerale la $T=20^{\circ}C$ (RO= ozmoza inversă) (preluat după Henry și Chambron, 2013).

Apă	Rezistivitate/ $\Omega \cdot cm$	pH	rH_2	$P/\mu W$
RO water	20,000	6.6	22.0	2
Mont Roucous	43,500	6.0	26.3	4
Rosée de la reine	28,100	5.2	28.0	9
Montcalm	22,300	5.6	28.4	11
Volvic	6,000	7.0	29.6	34
Evian	1,700	7.4	26.5	68
Perrier	1,370	5.5	24.3	109
Vittel	825	7.6	26.9	140
Badoit	519	5.9	24.9	280
Contrex	431	7.2	26.6	292
Hépar	383	7.3	30.0	524
St-Yorre	144	6.4	25.0	874

2. Proprietăți antioxidante ale apei alcaline

Dr. Hidemitsu Hayashi a cumpărat un aparat de electroliză pentru Clinica Medicală Kyowa încă din 1985. ERAW a fost ulterior utilizată în mod regulat pentru pregătirea meselor și drept apă potabilă pentru pacienți. El a observat o ameliorare clară la pacienții care suferă de tulburări gastro-intestinale și chiar o serie de alte patologii, inclusiv diabet, gută, ciroză hepatică, hepatită, hipertensiune și tumori maligne ale ficatului. Pentru a explica aceste îmbunătățiri, el a propus în 1995 o teorie conform căreia ERAW

exercită în primul rând proprietăți curative datorită prezenței dihidrogenului activat (H_2) care elimină eficient speciile reactive de oxigen (ROS), mai degrabă decât datorită alcalinității apei sau a potențialului redox (Hayashi, 1995). Chiar dacă această ipoteză este infirmată de faptul că dehidrogenaza există doar la bacterii, afirmațiile acestuia au permis:

- dezvoltarea unei metode alternative ieftine la aparatul de ionizare a apei pentru producerea de apă îmbogățită cu dihidrogen care prezintă proprietăți alcaline și reducătoare. Metoda se bazează pe o reacție electrochimică între apă și baghete de magneziu, rezultând ceea ce este cunoscut sub numele de apă de magneziu (MSW)

$$Mg + 2H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2$$
- interes crescut pentru proprietățile curative ale apelor reducătoare naturale găsite în surteri subterane situate la mare adâncime, precum Nordenau în Germania (apă NA), Hita Tenryosui (apă HT) sau Muntele Fuji (apă IF) din Japonia (Gadek și Shirahata, 2002);
- încurajarea echipelelor științifice să facă cercetări pentru a înțelege acțiunile fizico-chimice și mecanismele din spatele proprietăților reducătoare ale apei electrolizate.

Primul experiment *in vitro*, efectuat de Shirahata și grupul său în 1997, a demonstrat capacitatea ERAW, produsă de aparatele comerciale (Nihon Trim Co, Osaka, Japonia), de a distruge speciile reactive de oxigen, cum ar fi radicalii superoxizi ($O_2^{\cdot -}$) și peroxidul de hidrogen (H_2O_2), asemănător acțiunii enzimelor superoxid dismutază (SOD) și catalază (CAT).

În legătură cu un studiu al degradării ADN-ului de către radicalii liberi, cercetătorii au observat de asemenea, indirect, eliminarea radicalilor hidroxil mai agresivi (Shirahata și colab., 1997). Cu excepția efectului asupra radicalilor hidroxil, aceste rezultate au fost ulterior confirmate de către alte ape ERAW produse de un aparat construit în laborator folosind apă suplimentată cu 2 mM NaCl (Hanaoka și colab., 2004). Aceste tipuri de reacții, similare cu enzimele SOD și CAT, sunt posibile numai dacă hidrogenul dizolvat este prezent și activat în forma sa atomică. Din acest motiv, Shirahata și colegii săi au propus ipoteza cum că hidrogenul activ a fost stabilizat de PtNPs, eliberat prin degradarea electrozilor (Shirahata, 2002). Pentru a studia validitatea acestei ipoteze care este adesea utilizată ca argument comercial, o cercetare aprofundată utilizând o ERAW produsă de un aparat comercial din apa de la robinet filtrată peste rășină schimbătoare de ioni a ajuns la următoarele concluzii (Hiraoka și colab., 2004):

- a. nu a fost detectată nicio urmă de platină în niciuna dintre diversele probe studiate. În schimb, apa ionizată preparată din apă IF sau HY conținea ioni de vanadiu;

- b. activitatea anti-oxidantă a apei ERAW, MSW, HT (apă de adâncime din Hita Tenryosi, Japonia) și IF (apă din Muntele Fuji, Japonia), măsurată prin inhibarea oxidării moleculelor biologice, nu a prezentat nicio diferență în privința acidului ascorbic, tocoferolului sau polifenolilor;
- c. pierderea activității anti-oxidante a ERAW și MSW după fierbere arată că este implicat un transfer instabil al elementului H_2 . Concentrația de H_2 variază de la aproximativ $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ până la $1,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ la saturație, dar scade rapid, făcând necesar ca apa să fie consumată imediat. Un studiu realizat de Shimouchi și colab. (2012) a arătat că 50% din H_2 ingerat a fost expirat în timp ce țesuturile corpului au preluat 45%, unde își poate exercita activitatea anti-oxidantă. Pentru apele IF și HT, s-a observat doar o pierdere parțială a proprietăților lor antioxidante la fierbere, în funcție de rezistența proprietăților reducătoare ale ionilor de vanadiu prezenți;
- d. ERAW elimină radicalii de oxigen $O_2^{\cdot -}$ în mod exclusiv și nu pare să elimine radicalii hidroxil $HO^{\cdot}$, contrar rezultatelor lui Shirahata și colab. și Ohsawa și colab. Acest lucru se datorează probabil insuficienței sensibilității spectrometriei de rezonanță electronică pentru detectarea altor radicali;
- e. în mod ambiguu, proprietățile antioxidante pot fi explicate prin analize chimice, dar demonstrația științifică a ipotezei hidrogenului activ lipsește, chiar ținând cont că PtNP-urile ar fi putut fi eliminate prin filtrare din probe.

Aceste rezultate diverse confirmă probabilitatea ca ERAW și apa îmbogățită în mod natural sau artificial cu H_2 să poate elimina ROS, fapt ce a împins un număr de oameni de știință să efectueze cercetări experimentale *in vivo* folosind modele celulare și animale în patologii în care stresul oxidativ joacă un rol important, cum ar fi diabetul, cancerul și insuficiența renală.

3. Dovezi experimentale pentru efectele antidiabetice ale apei alcaline

Încă din 1997, s-a demonstrat că administrarea de ERAW la șobolani, scade concentrația nivelurilor de glucoză din sânge și de peroxid lipidic prin activarea hexokinazei (Wanatabe și colab., 1997). În 2002, grupul lui Shirahata a raportat efectele antidiabetice ale ERAW produse de un sistem de ionizare a apei Nihon Trim Co în comparație cu apa naturală de izvor NA sau HT, renumită pentru activitatea lor reducătoare. Studiul a utilizat linii de celule beta-pancreatice de hamster HIT-T15 tratate cu aloxan. Acesta a aratat faptul că efectele citotoxice induse de aloxan asupra celulelor au fost inhibitate de toate cele trei tipuri de apă (Li și colab., 2002).

Din punct de vedere biochimic, aceste ape par să activeze secreția de insulină în celule prin creșterea sensibilității lor la glucoză, apa naturală redusă (NA și HT) având un efect mai puternic decât ERAW. Acest studiu a arătat, de

asemenea, că, după încălzirea diferitelor ape într-un autoclav la 121°C, acestea au pierdut acele proprietăți și că apa minerală comercială nu are activitate antidiabetică. În 2005, grupul a demonstrat în continuare că aceleași tipuri de apă ca și cele utilizate în studiul anterior protejează celulele pancreatice de apoptoza indusă de aloxan (Li și colab., 2005). Efectul apei îmbogățite cu dihidrogen generat de baghetele de magneziu alcalogen asupra glicemiei și lipidemiei a fost studiat și la șobolanii OLETF, asupra unui model de diabet zaharat spontan de tip 2 (Jin și colab., 2006). Rezultatele au arătat că apa îmbogățită cu dihidrogen a stimulat creșterea și că ingestia sa pe parcursul a 32 de săptămâni a scăzut concentrațiile de glucoză, colesterol și trigliceride din sânge cu 10%-20% în comparație cu șobolanii de control care au băut apă de la robinet. Mai mult, nivelurile de glutamină-oxaloacetat transaminază (GOT) și glutamat-piruvat transaminază (GPT) secretate de celulele miocardice au scăzut cu 50% în comparație cu animalele de control. Pe baza acestor rezultate, autorii au sugerat că ERAW are un efect profilactic util asupra complicațiilor coronariene în diabet.

4. Dovezi experimentale pentru efectele anticancer ale apei alcaline

În 2001, Komatsu și colab. (2001) a publicat faptul că celulele adenocarcinomului pulmonar uman A549 și celulele fibrosarcomului uman HT1080, când au fost tratate cu ERAW, au prezentat un potențial redox redus, rezultând o rată de creștere redusă, în timp ce fibroblastele normale TIG-1 nu au fost afectate.

Shirahata și colab. (2002) au arătat de asemenea, că celulele carcinoamelor cervicale A549 sau HeLa cultivate în mediu preparat din ERAW și-au schimbat drastic morfologia, în timp ce morfologia TIG-1 a rămas normală. În general, celulele canceroase își datorează "nemurirea" activității telomerazice ridicate și faptului că telomerii lor nu se scurtează. În studiul menționat, deși activitatea telomerazei a rămas ridicată, telomerii au devenit mai scurți, fiecare diviziune celulară consecutivă sugerând că ERAW a redus capacitatea telomerazei de legare a telomerilor, ducând la scurtarea acestora.

Nisikawaa și colab. (2005) au studiat efectul protector al ERAW preparat cu ajutorul unui aparat de electroliză asupra celulelor BALB/c-3T3 tratate cu 3-metil colantren (compus inițiator) urmat de tratamentul cu phorbol-12-miristat-13-acetat (compus promotor). Aceștia au reușit să stabilească faptul că, pentru a inhiba promotorul, a fost necesar să se adauge PtNPs la ERAW (~10 ppm), deoarece ERAW singură a stimulat puternic transformarea malignă. Se pare că PtNP-urile sunt încorporate în celulele endoteliale din intestin, susținând ipoteza cum că dihidrogenul molecular intracelular este transformat în hidrogen activ de către PtNPs.

Fără prezența unui catalizator precum platina, nu se poate explica *in vitro* activitatea H_2 asupra ROS, cu excepția radicalului hidroxil. Este de asemenea important efectuarea de studii *in vivo* pentru a elucida mecanismul de acțiune al H_2 la nivel tisular și posibila sa activare de către PtNP-uri care, în plus, sunt ele însele susceptibile de a duce la probleme de toxicitate.

5. Cercetări experimentale privind efectele biologice ale NP

PtNP-urile sunt veritabili bureți de hidrogen, deoarece o dimensiune a particulelor de 2 nm pot absorbi până la 12% atomi de hidrogen per atom de platină sub o presiune parțială exercitată de H_2 care nu depășește 0,1 kPa (Isobe și colab., 2003). PtNP își exercită proprietățile de reducere prin transferul de electroni în peroxid de hidrogen și anumiți radicali liberi, cum ar fi 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil și 2,6-diclorofenol indofenol (Aiuchi și colab., 2004). PtNP-urile sunt, de asemenea, capabile să elimine radicalii superoxid și hidroxil (Watanabe și colab., 2009). Mărimea PtNPs poate varia de la 1 la 5 nm, cele mai mici particule fiind cele mai reactive față de ionii superoxid (Hamasaki și colab., 2008). La o doză de 50 mg^{-1} , nicio toxicitate nu este evidentă în celulele HeLa cultivate și, în lumina acestui fapt, este considerată așadar, ca un nou tip de antioxidant.

Majoritatea cercetărilor *in vivo* privind activitatea anti-oxidantă a PtNPs a fost efectuată în principal în legătură cu senescenta. Senescenta se caracterizează printr-o degradare a materialului celular datorită producției de ROS care se mărește odată cu îmbătrânirea, deoarece procesele de reparare se diminuează (Beckman și Ames, 1998). Modelul liber de nematod *Caenorhabditis elegans* utilizat și tulpinile dezvoltate pentru studii gerontogenomice au fost recunoscute ca fiind deosebit de potrivite pentru evaluarea efectelor stresului oxidativ asupra duratei de viață (Johnston și colab., 1993). În 2008, Kim și colab. au arătat că o reducere a duratei de viață după expunerea nematodului *C. elegans* la paraquat, un radical liber care induce stres oxidativ, se întâmplă numai la o concentrație de NP exact de 0,5 mM (nici mai mult, nici mai puțin). O creștere a duratei de viață a nematodelor cauzată de tratamentul cu salen-manganese care stimulează superoxidul dismutază și catalaza este consolidată în continuare de prezența NP (Kim și colab., 2008). Fixând NP-urile la o secvență peptidică care are o afinitate ridicată pentru platină și care este legată în continuare de o secvență peptidică derivată din HIV-1TAT și îi permite să treacă prin membrana celulară și să pătrundă în celule, internalizarea celulară a NP-urilor a fost crescută și doza eficientă pentru producerea acelorași efecte a fost acum de $5 \mu\text{M}$, ceea ce este de 100 de ori mai mică (Kim și colab., 2010).

Grupul lui Shirahata a studiat activitatea ERAW pe nematodul *C. elegans* (Yan și colab., 2010). Autorii au arătat că viermii cultivați în mediu preparat din ERAW au o durată de viață extinsă și că acest lucru protejează împotriva efectului de scurtare a vieții exercitat de paraquat. Există două componente ale ERAW care pot explica aceste rezultate: fie prezența H_2 dizolvat în apă, fie cantitățile mici de PtNP. Deși concentrația de H_2 este maxim 0,9 ppm ($0,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) la sfârșitul electrolizei, aceasta scade rapid la mai puțin de 50 de părți pe miliard (ppb) (0,05 ppm sau 0,25 μM). Efectele H_2 la concentrații atât de scăzute nu au fost niciodată cercetate. În schimb, o concentrație activă de NP la 2,5 ppb este inferioară concentrației de 0,5 mM (95 ppm), dar similară cu cea de 5 μM (5 ppb) ale particulelor care sunt interiorizate și observate de Kim și colab. Din acest motiv, Yan și colab. (2011) au desfășurat numeroase alte experimente pentru a elucida rolurile H_2 și PtNPs. Autorii au descoperit că NP-urile sintetice măresc semnificativ durata de viață a nematodelor și reduc acumularea de ROS indusă de paraquat. În schimb, apa îmbogățită cu hidrogen nu a avut niciun efect semnificativ asupra longevității nematodului. Aceste rezultate sugerează că nu H_2 , ci NP-urile din ERAW sunt responsabile pentru prelungirea duratei de viață a acestui model particular (și care nu pot fi generalizate și extrapolate la alte modele) prin eliminarea ROS. Autorii au putut concluziona că o concentrație a NP de 1,0 ppb ar fi fost internalizată în nematode. Deoarece această cantitate este atât de mică, ei concluzionează că este foarte probabil ca consumul de ERAW să nu aibă efecte secundare (Kim și colab., 2010). Acest lucru explică de ce testele de toxicologie au fost întotdeauna negative până acum și astfel, ERAW a declarat drept sigură spre a fi consumată (Saitoh și colab., 2010). Shirahata și colab. (2012) nu au explicat mecanismele chimice sau fizice care duc la degradarea electrodului și, prin urmare, la producerea de nanoparticule (NP) în timpul funcționării aparatului de electroliză și a căror concentrație probabil crește cu fiecare utilizare zilnică. În schimb, autorii explică faptul că H_2 este stocat în NP și activat prin activitatea sa catalitică. Activitatea catalitică este de fapt întărită deoarece densitatea electronică de suprafață legată de greutatea metalului este mai mare atunci când se află în stare nanocoloidală decât în stare solidă. Shirahata și colab. presupun în continuare că diferiți ioni minerali conținuți în apa naturală potabilă sunt reduși la catod și atomii eliberați se organizează sub formă de NP minerale. Unele minerale reacționează cu H_2 pentru a forma hidruri insolubile. Același lucru este valabil și pentru apa naturală NA și HT ale căror proprietăți anti-oxidante se datorează hidrogenului produs în timpul reacției anaerobe între roca bazaltică și apa deosebit de pură. Hidrurile stochează rezerve de hidrogen care pot fi eliberate prin hidroliză. Stevens și Mc Kinley (1995) au raportat dovezi pentru o suprafață anaerobă

activă susținută de viața microorganismelor, derivând energie din H_2 produs geochimic, numită ecosistem microbial litoautotrof, în acviferul bazaltic profund.

Studiul toxicității NP-urilor nu a fost văzut ca o problemă în contextul dezvoltării nanotehnologiei (Handy și colab., 2008). În primul rând sursele de contaminare sunt foarte rare și în al doilea rând, metalul în sine este considerat ca fiind biologic inert. Abia recent a apărut problema toxicității datorită utilizării pe scară largă a catalizatorilor de evacuare care dispersează NP pe măsură ce îmbătrânesc datorită utilizării derivaților de platină pentru utilizare terapeutică sau aplicații industriale. S-a stabilit că nivelurile de platină în urină cresc și că acești compuși sunt bio-asimilabili. Datorită dispersiei lor în atmosferă, toxicitatea prin inhalare a făcut obiectul unor recente studii științifice (Elder și colab., 2007). Aceste studii se bazează pe măsurarea captării intracelulare a NP în raport cu forma lor (sferă, în formă de floare sau cu vârfuri multiple) cu dimensiuni cuprinse între 10 și 30 nm și capacitatea lor de a induce stres oxidativ sau inflamații în celulele endoteliale pulmonare sau vasculare. Pe baza markerilor de stres oxidativ și inflamație, toxicitatea rezultată din concentrațiile de NP care sunt produse în timpul poluării mediului sau a atmosferei industriale este nedetectabilă. Când dozele mult mai mari decât cele discutate sunt administrate celulelor în cultură, efectele biologice nu depășesc 35%. Cu toate acestea, toxicitatea indusă depinde de starea submicroscopică a metalului. În schimb, toxicitatea inerentă datorată acțiunii chimice catalitice a platinei asupra căilor de reducere a oxidului din organism și, în special, asupra ficatului, unde particulele se acumulează, nu a fost niciodată demonstrată.

Studiul toxicologic realizat de Saitoh și colab. și la care Yan și colab. (2011) se referă, a concluzionat că ERAW nu prezintă un risc pentru sănătatea umană. Într-adevăr, niciun semn de intoxicație nu a fost observat vreodată pe baza examenului clinic, a valorilor hematologice, a parametrilor biochimici ai sângelui și a urinei sau a histopatologiei organelor principale. Cu toate acestea, contaminarea ERAW de către NP și consecințele sale biologice nu au fost încă larg abordate.

6. Cercetări experimentale privind proprietățile biologice și terapeutice ale dihidrogenului

Deși proprietățile reducătoare ale H_2 sunt bine cunoscute în chimie, acest gaz este considerat ca fiind nereactiv cu țesuturi, în condiții fiziologice. Cu toate acestea, potențialul său terapeutic pentru cancer a fost profund cercetat în SUA (Dole și colab., 1975), iar pentru inflamații în Anglia (Jones, 1996) și în Franța (Gharib și colab., 2001). În 2007, munca experimentală a

echipei de cercetare a profesorului Shigeo Ohta a reînviat interesul pentru beneficiile terapeutice ale H_2 și a furnizat dovezi convingătoare care susțin importanța hidrogenului pentru funcția celulară în organism (Ohta, 2011). Această lucrare a stimulat cercetări experimentale clinice privind eficacitatea terapeutică a hidrogenului disponibil în dozele nou dezvoltate, concurând cu utilizarea ERAW. Ohsawa și colab. (2007) au demonstrat în modele experimentale de diferite boli faptul că selectivitatea H_2 elimină o formă foarte reactivă de oxigen: radicalul hidroxil $HO\bullet$. Cu toate acestea, H_2 nu reacționează spontan cu anionul radical superoxid ($O_2^{\bullet-}$), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) sau radicalii oxizilor nitrici ($NO\bullet$) care joacă un rol fiziologic în semnalizarea celulară și apărarea imunitară.

Eficacitatea terapeutică a H_2 demonstrată în această publicație a trezit un interes considerabil asupra oamenilor de știință și medicilor din Japonia, Coreea și China. A creat un studiu intensiv asupra mai multor stări de boală, dintre care unele au fost deja explorate, dar administrând H_2 folosind noi proceduri, cum ar fi injecția, inhalarea, picăturile de ochi, ingestia de apă îmbogățită în hidrogen prin barbotarea gazului în apă, prin electroliză sau prin reacția electrochimică a magneziului cu apa și prin creșterea H_2 intestinal endogen consumând o dietă bogată în alimente cu conținut ridicat de amidon, lapte și curry (Ohta, 2011), manitol, inhibitori ai α -glucozidazei etc. (Zheng și colab., 2011). Beneficiile administrării hidrogenului au fost din nou demonstrate pe:

- modele experimentale de ischemie urmate de reperfuzie pe creier, inimă și leziuni ale rinichilor, plămânilor și intestinului, pentru aceste ultime trei organe cercetându-se și efectele cu privire la rezultatul unui transplant;
- deteriorarea sistemului nervos central, hipoxie la nou-născuți și apoptoză, infarct și transformarea hemoragică după infarct și transformarea hemoragică după obstrucția arterei cerebrale medii, asfixia perinatală a porcușorilor de guinea nou-născuți, degenerarea cerebrală și modele ale bolii Parkinson, Alzheimer și îmbătrânirea accelerată;
- inflamație într-o varietate de modele de hepatită, pancreatită acută indusă de arginină, colită indusă de acțiunea sulfatului de dextran de sodiu, septicemie, inflamație generală indusă de zimosan;
- neurotoxicitatea indusă de cis-platină utilizată în chimioterapie și leziunile celulelor capilare acustice cauzată de antimicină;
- leziuni ale creierului sau măduvei spinării, leziuni cauzate de radiațiile ionizante la nivelul limfocitelor, endoteliului gastro-intestinal, probleme de auz și pierderea auzului, arsuri ale corneei datorate sodei caustic;
- diabetul zaharat de tip I și II, intoleranță la glucoză, potențial sindrom metabolic;

- alergii;
- bătrânețe (Beckman și Ames, 1998).

Articolele publicate ale lui Zheng și colab. și Shirahata și colab. conțin bibliografii cuprinzătoare care citează cercetările de mai sus. Radicalul hidroxil este cel mai reactiv dintre speciile ROS. În timpul evoluției, mamiferele au pierdut orice sistem endogen de detoxifiere pentru neutralizarea speciilor ROS. Datorită capacității hidrogenului de a elimina ionii radicali, acesta poate exercita un efect citoprotector care previne degradarea biopolimerilor celulari. Acțiunea H_2 de asemenea, depășește doar eliminarea de ROS în exces. O serie de studii au arătat un efect al H_2 asupra reglării expresiei genelor, acționând direct asupra căilor de semnalizare celulară care sunt stimulate de ROS în exces (Itoh și colab., 2011). În orice caz, multe dintre reacțiile care apar în prezența unor cantități mici de H_2 trebuie încă elucidate (Ohta, 2011). Această activitate amplă de cercetare privind consecințele biologice ale H_2 a avut cu siguranță un impact asupra evaluărilor clinice care au fost făcute recent. Evaluări clinice întreprinse în Japonia pentru a evidenția caracterul adecvat al ERAW pentru tulburările gastro-intestinale a făcut posibil ca Ministerul Sănătății, Muncii și Bunăstării să certifice dispozitivele ionizante și să permită hemodializa utilizând ERAW (de înțeles, deoarece hemodializa necesită un flux continuu de lichid pentru dializă). Aproape toate evaluările clinice pentru a demonstra efectele benefice ale administrării H_2 erau efectuate cu apă îmbogățită cu H_2 , prin contact direct cu gazul sau prin acțiune electrochimică între magneziu și apă (RSM).

7. Studii privind efectele ERAW

7.1. Probleme gastro-intestinale

Primele studii clinice dublu-oarbe referitoare la tulburările gastro-intestinale au fost prezentate la cea de-a 25-a Adunare Generală a Conferinței medicale japoneze din aprilie 1999 și publicate de Tashiro și colab. În acest studiu, voluntarii au consumat 1 litru de ERAW în fiecare zi timp de 12-15 zile. S-au observat îmbunătățiri pe baza diferitelor aspecte clinice vizate: diaree cronică, constipație, fermentație intestinală, hipercolie. Aceste teste au permis autorităților japoneze să autorizeze utilizarea electrolizatoarelor domestice pentru tratamentul tulburărilor gastro-intestinale. Au fost prezentate alte rezultate pozitive cu privire la beneficiile ERAW pentru tratarea leziunilor mucoasei gastrice și intestinale de către Dr. Yoshikazu, în ciuda scepticismului și a eforturilor de a arăta rezultate negative.

7.2. Hemodializa cu ERAW

Hemodializa este adesea utilizată pentru curățarea excesului de toxine sau deșeuri metabolice din sânge la pacienții cu insuficiență renală severă.

Această procedură poate duce la stres oxidativ care provoacă boli cardiovasculare. Un studiu clinic a fost efectuat pe 22 de bărbați și 15 femei supuși hemodializei efectuat cu ERAW furnizat de un aparat comercial care a fost adaptat la un hemodializator (Huang și colab., 2003). S-au măsurat următorii parametri sanguini: starea totală anti-oxidantă (TAS), activitatea anti-oxidantă a plasmiei, nivelul proteinelor/aminoacizilor oxidați, peroxidarea lipidelor, nivelurile interleukinei-6 (IL6) și concentrația proteinei C-reactive. S-a demonstrat că hemodializa cu ERAW ajută la creșterea apărării imune a organismului împotriva stresului oxidativ, eliminând în special peroxidul de hidrogen și anionul hipoclorit. În acest exemplu, ERAW pare să scadă modificările apărute la nivelul leucocitelor, celulelor endoteliale și eritrocitelor (Huang și colab., 2006).

Într-un alt studiu, 21 de participanți, stabiliizați prin hemodializă standard, au fost supuși unei dialize cu ERAW la o rată de trei ședințe pe săptămână (Nakayama și colab., 2010). Apa dedurizată și filtrată peste cărbunele activ a fost electrolizată. Aceasta a fost introdusă într-un echipament de osmoză inversă conectat la un aparat de hemodializă personal care livrează o soluție de hemodializă cu o concentrație medie de dihidrogen de 48 ppb. Nu au fost observate efecte secundare în timpul evaluării. Presiunea arterială sistolică a scăzut la un număr semnificativ de pacienți până la 140 mm Hg. Autorii cred că efectul hipotensiv al H_2 se datorează activității sale anti-oxidante și eliminării ROS, inclusiv peroxinitratul, o substanță care provoacă hipertensiune renală prin reducerea radicalilor nitrozilici (Nakayama și colab., 2010).

Pe scurt, este posibil ca hemodializa cu ERAW să îmbunătățească răspunsul inflamator și controlul tensiunii arteriale la pacienții cu hemodializă.

7.3. Studii despre acțiunea terapeutică a apei reduse neutre îmbogățite în dihidrogen

Kajiyama și colab. (2008) au efectuat un studiu randomizat, dublu-orb, controlat cu placebo, privind tratamentul diabetului zaharat de tip II la 30 de pacienți diabetici (T2DM) și șase pacienți afectați de intoleranță la glucoză. Apa naturală a fost purificată mai întâi prin trei procedee de filtrare: filtrare prin osmoză inversă, prin rășini schimbătoare de ioni și ultrafiltrare prin membrana milipor. Apa redusă neutră bogată în H_2 a fost produsă prin dizolvarea directă a gazului barbotat în apă. Concentrația de H_2 a fost de $1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ și concentrația în O_2 a fost $0,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pentru un potențial redox de -600 mV. Având în vedere cantitatea de H_2 eliminat prin expirație, a fost recomandat un aport de 900 ml de apă hidrogenată pe zi, timp de 12 săptămâni, pentru a menține o concentrație de H_2 suficientă în țesuturi și 900 ml de apă pură pe zi

pentru grupul martor în aceeași perioadă de timp, urmată de o perioadă de curățare de 12 săptămâni. Toți parametrii au fost analizați la începutul evaluării, la opt săptămâni și la sfârșitul evaluării. Concentrațiile serice de LDL și LDL dens mic (sdLDL) au scăzut semnificativ după ce au băut apă cu hidrogen, dar nu s-a modificat nivelul colesterolului, concentrația lipoproteinelor cu densitate ridicată (HDL), colesterolului lipoproteinelor cu densitate mică (LDLc), RPLc, nivelul trigliceridelor sau al non-acizilor grași esterificați. În mod similar, nivelul glicemiei și insulinei în repaus alimentar și procentul de HbA1c nu au fost modificate. Autorii nu au putut găsi o explicație clară pentru reducerea concentrațiilor de emLDL, sdLDL și ulsoP, altele decât protecția lipoproteinelor de membrană de către H₂ împotriva oxidării. În cele din urmă, patru pacienți din șase cu intoleranță la glucoză au fost normalizați. Pentru a explica aceste rezultate, autorii au invocat ipoteza că dihidrogenul difuzează ușor în țesuturi și protejează ADN-ul împotriva efectelor dăunătoare ale ROS, influențând transcripția și contribuind la îmbunătățirea rezistenței la insulină. În concluzie, autorii indică faptul că absorbția apei bogate în hidrogen are un rol benefic de jucat în prevenirea T2DM și a rezistenței la insulină.

7.4. Studii despre acțiunea terapeutică a MSW

Sindromul metabolic se caracterizează printr-un grup de factori de risc metabolici: obezitate, niveluri ridicate de insulină, tensiune arterială crescută și dislipidemii. Prin urmare, stresul oxidativ ar trebui să joace un rol cheie în patogeneza acestei tulburări. Un studiu pilot a fost întreprins la Universitatea din Pittsburgh pentru a evalua eficacitatea acestui tip de apă la 20 de subiecți (10 bărbați și 10 femei) a căror stare biologică (greutate, cantitatea de zaharuri din sânge, lipemie și colesterolemie) a condus la dezvoltarea sindromului metabolic (Nakao și colab., 2010).

MSW a fost preparat cu ajutorul unei baghete de magneziu pentru a obține o concentrație de 0,55-0,65 mM. Testele de rutină ale markerilor biologici indicativi ai acestui sindrom, precum și ai markerilor de stres oxidativ au fost efectuate după proceduri standard: hemoleucogramă, creatină, aminotransferază, gama glutamiltransferază bilirubină, colesterol total, HDL, LDL, trigliceride, glucoză în sânge, 8-hidroxi-2'-deoxiguanozină, 8 izoprostan, superoxidismutază și acid tiobarbituric. Fiecare pacient a băut 300-400 ml de apă de cinci ori pe zi: dimineața înainte de micul dejun, o oră după prânz, două ore după gustarea de după-amiază, cu o oră înainte de cină și cu jumătate de oră înainte de culcare. Acest lucru oferă un consum total de 1,5-2 L maxim pe zi pe parcursul a opt săptămâni. Consumul de MSW a dus la o creștere cu 39% a nivelului de SOD, o scădere a acidului tiobarbituric cu 43% în urină, o creștere cu 8% a HDL și o scădere cu 13% a colesterolului total. Nu a existat

nicio modificare observabilă a nivelului zahărului din sânge. Autorii au concluzionat că aportul de MSW îmbunătățește nivelul markerilor stresului oxidativ și întărește activitatea anti-oxidantă a organismului.

Oboseala asociată cu o creștere a stresului oxidativ și a inflamației datorită formării ROS prin radiații X alterează, de asemenea, calitatea vieții pacienților. Kang și colab. (2011) au publicat un studiu asupra eficienței tratamentului cu ajutorul MSW. Investigația a fost efectuată pe 49 de pacienți care sufereau de cancer hepatic. Pacienții (33 bărbați și 13 femei) cu o vârstă medie de 56,3 ani, diagnosticați cu carcinom hepatocelular au fost tratați prin radioterapie. Au fost separați în două grupe prin tragere la sorți. Unul dintre grupuri a fost supus la consumul de 10 ori pe zi a 100-300 mL de ERAW, obținând 1,5-2,0 L pe zi, al doilea grup a primit un placebo. Tratamentul a fost început în primele zile după începerea radioterapiei și a continuat timp de șase săptămâni. Pacienții au completat un chestionar, conform cu echivalentul coreean al Organizației Europene pentru Cercetare și Tratamentul Cancerului (Instrumentul QLQ-C30) cu anumite modificări care permit o evaluare a stării de sănătate cu crearea unei Scale a Calității Vieții (QOLS) care reflectă nivelul simptomelor și diminuarea acestora. În cadrul QOLS, au fost evaluate cinci niveluri funcționale, și anume: starea fizică, funcția cognitivă, emoțiile, relațiile sociale cu evaluarea a trei simptome diferite (durere, oboseală, greață sau vărsături) și șase elemente simple (dispnee, insomnie, pierderea poftei de mâncare, constipație, diaree).

Concentrația derivaților oxidați metabolizați (dROM) și puterile biologice anti-oxidante (BAP) au fost evaluate din prima până în a șasea săptămână de radioterapie. Măsurători ale parametrilor biologici, hemoleucograma, aspartat aminotransferaza, transpeptidaza gama glutamică și colesterolul au fost, de asemenea, incluse în aceeași perioadă de timp.

În cadrul studiului s-au concluzionat următoarele: consumul de MSW a îmbunătățit calitatea vieții pacienților începând cu prima săptămână de tratament. MSW nu a avut niciun efect asupra tulburărilor gastro-intestinale. Consumul de MSW a scăzut sistematic concentrația derivaților metaboliților reactivi ai oxigenului, derivaților oxigenați, a menținut activitatea anti-oxidantă endogenă în ser care se deteriorează în timpul radioterapiei și nu a modificat funcția hepatică sau compoziția sângelui.

7.5. Efecte sistemice și locale ale expunerii pe termen lung la apă alcalină de băut la șobolani

Sănătatea mucoasei bucale este afectată de starea nutrițională și de expunerea la diverși factori extrinseci, cum ar fi microorganismele și substanțele chimice. Ca barieră mucoasă, saliva are o funcție de protecție

importantă împotriva unei varietăți de agenți potențial nocivi, toxine și substanțe chimice periculoase. pH-ul cavității bucale este menținut în valori relativ neutre de capacitatea de tamponare a salivei (Mandel, 1987). Modificările acide ale cavității bucale datorate metabolismului bacterian, băuturilor acide și refluxului, sunt bine cunoscute. Pe de altă parte, modificările aduse condițiilor alcaline au primit mult mai puțină atenție. Cu toate acestea, o schimbare alcalină în mediul extracelular poate influența proprietățile de creștere ale celulelor (Eagle, 1973), iar stresul alcalin pe termen scurt poate provoca chiar activitate proliferativă (Zetterberg și Engstrom, 1981).

Alcalinitatea tranzitorie a cavității bucale poate fi cauzată de o varietate de factori, de exemplu produsele din tutun, considerate în prezent cei mai importanți factori cauzali ai cancerului oral. Fumul de trabuc este în general mai alcalin decât fumul de țigară (Brunnemann și Hoffmann, 1972). Efectele farmacologice ale tutunului sunt legate de alcalinitate, datorită absorbției sporite a nicotinei prin mucoasă într-o formă liberă (Tomar și Henningfield, 1997). Produsele din tutun fără fum, populare în Scandinavia și SUA, au un pH alcalin ridicat (Axell 1993), reglementat de agenți de tamponare (Gothia Tobak 1999). Produsul sudanez din tutun fără fum, denumit *toombak* (cu un pH de aproximativ 9,6) poate provoca modificări ale mucoasei bucale cel puțin parțial atribuibile alcalinității sale (Idris și colab. 1996). Mestecarea nucilor de betel asociată cu utilizarea pastei de var, constând în principal din hidroxid de calciu și aditivi alimentari (Jeng și colab. 1994), ridică rapid pH-ul oral la 10 (Thomas și MacLennan, 1992).

S-a dovedit că apa potabilă în unele zone geografice este alcalină, cu valori uniforme ale pH-ului mai mare de 9.5 (Kujala-Raëty și colab. 1998). Substanțele alcaline sunt utilizate și în îngrijirea dentară. Pasta de dinți pe bază de bicarbonat are pH-ul cuprins în intervalul de 8-9,4. Hidroxidul de calciu este utilizat ca agent terapeutic pentru cariile profunde și rănila pulpei dentare pentru a accelera vindecarea (Torneck și colab. 1983). Cu toate acestea, nu au fost raportate studii privind reacțiile mucoasei orale la alcalinitate ridicată.

Încurajate de conștientizarea acestor condiții alcaline în cavitatea bucală și de proprietățile mitogene potențiale sugerate ale pH-ului alcalin, numeroase studii au fost concepute pentru a evalua efectele expunerii pe termen lung la apă alcalină potabilă, conținând $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sau NaOH , asupra morfologiei epitelului bucal și a altor organe la șobolani. În plus, expresia unui grup extins de proteine implicate în diferențierea keratinocitelor, proliferarea celulară, aderența celulară și stresul celular, au fost analizate folosind probe de biopsie ale mucoasei bucale.

Un astfel de studiu a fost realizat asupra unui grup de 48 de șobolani din tulpina Long-Evans. Aceștia au fost împărțiți în patru grupuri de studiu și un

grup de control. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sau NaOH au fost utilizate pentru a crește pH-ul apei. Aportul de apă a fost monitorizat intermitent în toate grupurile, fără a arăta diferențe între grupuri. În mod similar, aportul de alimente a fost egal între șobolanii de studiu și cei de control.

În grupurile 1, 2 și 3, experimentul a fost început când șobolanii aveau vârsta de 12 săptămâni, iar în grupurile 4 și 5 la vârsta de 6 săptămâni. Durata experimentului în toate grupurile a fost de un an (52 de săptămâni), corespunzând unei expuneri de 30 de ani la oameni. După finalizarea studiului, șobolanii au fost uciși folosind dioxid de carbon, iar probele de necropsie au fost prelevate din mucoasa bucală, bolta palatină, limbă, esofag, stomac, intestine, ficat și rinichi. În grupurile 4 și 5, s-au obținut probe suplimentare din glandele salivare (parotide, submandibulare și sublinguale), mușchiul maseter, tiroidă, hipotalamus și ovar sau testicule.

Toate animalele au supraviețuit experimentului și au rămas în stare bună până la sfârșitul acestuia. Cu toate acestea, șobolanii femele, în special din grupa 2, dar și din grupurile 4 și 5, au prezentat o blană mată și subțire în unele regiuni la sfârșitul experimentului. O oarecare decolorare a mucoasei bucale a fost observată la șobolanii din grupa 2.

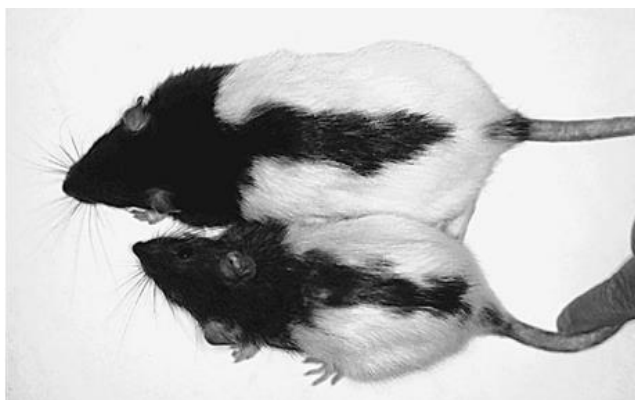


FIG. 3. Femelă din grupul de control (sus) comparativ cu o femelă din grupul 2 (preluat după Merne și colab., 2001).

Toate animalele au fost cântărite la finalizarea experimentului. Greutatea medie a șobolanilor în toate grupurile experimentale a fost mai mică (1-29%) decât cea a animalelor de control. Cea mai mică greutate corporală a fost observată la șobolanii cărora li s-a administrat $\text{Ca}(\text{OH})_2$ și la cei cu expunere, începând cu vârsta de 6 săptămâni. Astfel, greutatea șobolanilor din grupurile experimentale au diferit semnificativ din punct de vedere statistic de

cele ale martorilor (testul Kruskal-Wallis) la următoarele grupuri: femele din grupa 2, femele din grupa 4, femele și masculi din grupa 5.

La examinarea microscopică, epiteliul mucoasei bucale, al palatului și al limbii șobolanilor din grupurile de studiu au fost similare ca morfologie și structură cu cele ale controalelor. Nu s-au observat atrofii mucoase definite sau ulceratii la niciunul dintre șobolani. Unul dintre șobolanii din grupa 2 a prezentat hiperkeratinizare moderată a epiteliului. Infiltratele de celule inflamatorii, constând în principal din limfocite în *lamina propria* a mucoasei bucale, au fost observate în toate grupurile, cu excepția grupului 5. În probele de țesut lingual, infiltrațiile limfocitare au fost cele mai răspândite în probele de control. La un șobolan mascul din grupa 4, celulele multinucleate erau prezente în mucoasa bucală. Mastocitele au fost cele mai abundente la șobolanii din grupa 3, atât în probele din mucoasa bucală, cât și din limbă. Un mascul în grupa 3 și o femelă în grupa 4 au prezentat calcificații în limbă.

TABEL 2. Comparația datelor despre masa corporală între controale și cobai (preluat după Merne și colab., 2001).

Grup	Gen	Număr de cobai	Media masei corporale (g)	Interval de masa (g)	SD (+/-)	Media masei corporale comparativ cu controlul (g)	Valoarea P- (Kruskal-Wallis)	Valoarea P- (cu corectura Bonferroni)
1. Control	F/M	6/6	233/420	212-240 / 382-468	10,56 / 32,37			
2. Ca (OH) ₂ , pH 11.2	F/M	6/6	221/373	210-227 / 322-432	6,06 / 48,22	-12 / -47	0,0370 / 0,1269	0,148 / 0,5076
3. NaOH, pH 11.2	F/M	6/6	229/416	216-255 / 347-471	85,98 / 41,78	-4 / -4	0,3358 / 1,0000	1,3432 / 4,0000
4. Ca (OH) ₂ , pH 12	F/M	3/3	206/372	187-207 / 357-385	5,68 / 14,19	-27 / -48	0,0196 / 0,0518	0,0784 / 0,2072
5. NaOH, pH 12	F/M	3/3	199/325	187-207 / 315-341	10,79 / 14,22	-34 / -95	0,0196 / 0,0201	0,0784 / 0,0804

La probele obținute din țesuturi extraorale, nu s-au observat modificări marcante după expunerea la apă alcalină. În glandele salivare, infiltrarea limfocitelor a fost prezentă la șobolanii grupului de control 1 și în grupele 3 și 4. În grupa 2, nu s-au observat modificări inflamatorii, dar 3/12 (25%) din probele din glanda salivară au prezentat caracteristici atrofiate. În intestinul subțire, un șobolan din grupa 3 a prezentat calcificări. La șobolanii tratați cu hidroxid de calciu, unul (8%) din șobolanii din grupa 2 au prezentat atrofie a

vilozităților intestinale și s-a detectat un granulom la un șobolan femel din grupa 4. S-au observat calcificări la rinichi la 5 (42%) șobolani din grupul 3 și, de asemenea, la 67% dintre șobolanii martori.

Pankeratina, care detectează keratinele 5, 6, 8, 17 și 19, a fost puternic exprimată pe întregul epiteliu în toate probele din fiecare grup de studiu. Epiteliul a arătat o colorare intensă a tuturor straturilor supra-bazale cu CK4, cât și CK5, în timp ce toate probele din mucoasa bucală s-au demonstrat total negative pentru CK19. Nu au fost observate diferențe în intensitatea sau cantitatea de expresie în rândul grupurilor. PCNA cu colorare limitată la stratul bazal al epitelului, nu a arătat diferențe în cantitatea sau intensitatea expresiei între grupuri.

Expresia slabă a HSP60 a fost observată în nucleul celulelor bazale, cel mai frecvent în grupa 5 (83%) și în grupa 3 (67%). Expresia nucleară HSP 70 a fost localizată în principal la celulele bazale, prezentă în 12/12 (100%) probe de șobolani din grupa 2 și în 5/6 (83%) din grupa 4 (tratată cu hidroxid de calciu). La șobolanii cărora li s-a administrat hidroxid de sodiu în apă, HSP 70 a fost observat la 7/12 (58%) dintre șobolanii din grupa 3 și la 4/6 (67%) din grupa 5. La martori, expresia HSP 70 a fost observată doar în 4/12 (33%) probe.

Dintre moleculele de adeziune celulară, ICAM-1 nu s-a colorat în 6/12 probe de la șobolanii cărora li s-a administrat Ca(OH)_2 cu pH 11,2 (grupa 2). Toate probele de la șobolanii martor și grupul 3 au fost colorate pozitiv pentru CD44, în timp ce jumătate din probele din grupul 4 și grupul 5 au rămas CD44 negative.

TABEL 3. Colorare imunohistochimică pozitivă în monstrele din mucoasa bucală provenită de la grupurile de studiu și control (preluat după Merne și colab., 2001)

Anticorp	Grupul 1 (control)	Grupul 2	Grupul 3	Grupul 4	Grupul 5
Pankeratină	12/12	12/12	12/12	6/6	6/6
CK 19	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6
CK 5	12/12	12/12	12/12	6/6	6/6
CK 4	12/12	12/12	12/12	6/6	6/6
PCNA	12/12	12/12	12/12	6/6	6/6
HSP 60	6/12	5/12	8/12	3/6	5/6
HSP 70	4/12	12/12	7/12	5/6	4/6
HSP 90	12/12	12/12	11/12	6/6	6/6
S-100	12/12	12/12	12/12	6/6	6/6
ICAM-1	0/12	6/12	0/12	0/6	0/6
CD44	12/12	10/12	12/12	3/6	3/6
CD68	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6

Acest studiu a investigat efectele sistemice (asupra organelor) și locale (asupra mucoasei bucale) ale administrării pe termen lung a apei alcaline de băut la șobolani. Organele parenchimatose și probele din mucoasa bucală au

fost examinate pentru observarea modificărilor morfologice, iar acestea din urmă și pentru exprimarea proteinelor care reglementează diferențierea keratinocitelor, proliferarea celulară, aderența intracelulară și stresul celular.

La sfârșitul experimentului cu durata de un an, șobolanii expuși la apă alcalină potabilă au avut greutate corporală semnificativ mai mici decât martorii. În plus, blana mată și neuniformă observată la unele dintre animalele testate sugerează un răspuns sistemic toxic sau metabolic la apa alcalină. Cu toate acestea, mecanismele de bază responsabile de un astfel de răspuns nu sunt ușor de recunoscut pe baza constatărilor. Astfel, nu au putut fi observate modificări sistematice brute sau morfologice în oricare dintre organele sau țesuturile parenchimatoase interne examinate la microscopul optic. Totuși, acest lucru nu exclude posibilitatea altor factori, de exemplu atrofia sistemică a acestor organe, care pot fi recunoscute în mod fiabil numai prin măsurători cantitative, care nu au fost făcute în acest studiu. Greutatea corporală a fost cea mai mică la șobolanii ce au început ingestia de apă alcalină la vârsta de 6 săptămâni. La oameni, acidoza metabolică la copii poate duce la inhibarea creșterii, așa cum s-a raportat la copiii cu acidoză tubulară (Chan 1983). Astfel, se poate specula faptul că modificarea alcalinității la șobolanii tineri ar putea afecta metabolismul electroliților sau al aldosteronului responsabil pentru întârzierea observată a creșterii. De un interes deosebit în acest sens este rolul $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ale căror efecte asupra greutății corporale au fost deosebit de pronunțate la femele.

Există, însă, unele studii anterioare care sugerează că un mediu alcalin poate avea diverse efecte la nivel celular. Efectele dramatice observate după ingestia accidentală a substanțelor alcaline precum leșia sunt bine stabilite (Howell, 1986). În mod similar, degenerescența, hemoragia și eroziunea mucoasei gastrice și edemului submucos au fost raportate la șobolani la 15-60 min după administrarea de soluții de detergenți alcalini (Sauers și colab. 1994). Tratamentul cu NaOH 0,3N a fost utilizat experimental pentru a induce ulcer gastric la șobolani (Cheon și colab. 1999). Cu toate acestea, nu a fost observată nicio modificare histologică a tractului gastro-intestinal în acest studiu, sugerând un răspuns adaptativ, care poate include stimularea mucusului, secreția de bicarbonat, rezistența crescută a mucoasei, precum și motilitatea gastrică și fluxul sanguin gastric crescut (Cheon și colab. 1999).

Studiile anterioare au arătat că un mediu extracelular alcalin poate influența proprietățile de creștere ale celulelor. Perioadele scurte (2-10 min) de expunere la substanțe alcaline (pH de la 8,5 la 10) prin adăugarea de NaOH în mediul de cultură celulară s-au dovedit a avea un efect mitogen asupra fibroblastelor embrionilor de șoarece fără niciun semn de efecte toxice (Zetterberg și colab., 1982). În mod similar, extractul de apă de var (Jeng și

colab., 1994), precum și cristalele de hidroxiapatita și carbonat de calciu (Cheung și McCarty, 1985) s-au dovedit a crește proliferarea fibroblastelor cultivate. Un studiu care a aratat transformarea celulelor renale canine în celule tumorale diferențiate numai după expunerea la un mediu moderat alcalin (pH 7,8) timp de două săptămâni (Oberleithner și colab. 1991) indică efecte profunde ale alcalinității asupra creșterii și proliferării celulare. Nu au fost observate modificări sistemice ale organelor, cum ar fi proliferarea fibroblastelor (cicatrici), în oricare dintre organele parenchimatoase explorate în studiul lui Merne și colab. (2001).

O mare parte din accentele studiului descris a fost asupra evaluării efectelor locale ale apei alcaline asupra mucoasei bucale, prin analiza morfologiei și expresiei proteinelor de reglare a celulelor, deoarece datele studiilor anterioare implică tratamentul alcalin drept cauză a diferitelor afecțiuni locale ale mucoasei. Astfel, la șobolani sau hamsteri, vopsirea mucoasei bucale cu pastă de hidroxid de calciu în mod regulat pe o perioadă lungă de timp poate duce la atipie celulară, dar nu la malignitate (Jin și colab., 1996). Utilizatorii de tutun masticabil de betel, împreună cu var stins alcalin dezvoltă în mod regulat depunerea de țesut fibros în straturile submucoase ale mucoasei bucale (Cox și Walker, 1996). Cu toate acestea, în probele prelevate nu au fost observate astfel de modificări fibroase sau atipii celulare epiteliale la șobolanii tratați cu apă alcalină. Nu s-a observat niciun efect asupra ratei de proliferare a celulelor, după cum reiese din expresiile PCNA identice în grupurile de studiu și șobolanii martor. Această constatare este în acord cu colorarea total negativă a cheratinei CK19, a cărei expresie supra-bazală este asociată cu proliferarea epitelială (Depondt și colab., 1999). Descoperirile realizate de echipa lui Merne în anul 2001 sunt în concordanță cu rezultatele unui studiu *in vitro* care nu a reușit să arate nicio inducere a proliferării celulare prin tratament alcalin, măsurată prin numărarea celulelor și încorporarea timidinei (Burroni și Ceccarini, 1984). Într-un alt studiu, tutunul (snuff) și tutunul alcalin (pH 9,3) modificate de carbonat de sodiu, nu au reușit să inducă modificări atribuibile alcalinității în mucoasa orală a șobolanilor (Hirsch și Johansson, 1983). O explicație pentru absența unor modificări marcate ale epiteliului oral în acest studiu poate fi că influența apei alcaline este de scurtă durată datorită eliminării rapide a acesteia din mucoasa bucală. Astfel, efectul alcalinității cu aplicarea pastei de hidroxid de calciu poate fi mult mai pronunțat, datorită efectului iritant al pulberii și a reținerii acesteia în mucoasă. pH-ul salivei de șobolan este, de asemenea ridicat, între 8 și 9 (Hirsch 1983), și ar fi putut influența rezultatele studiilor efectuate. Mai mult, epiteliul bucal al șobolanilor este, în general, keratinizat și, prin urmare, poate fi rezistent la efectele agenților iritanți exogeni.

De un anumit interes a fost efectul expunerii alcaline asupra expresiei moleculelor de adeziune CD44 și ICAM-1. Expresia receptorului CD44 a fost ușor mai slabă ca intensitate în grupurile experimentale și complet absentă la jumătate din șobolanii care au primit apă cu pH ridicat. Mai multe studii au arătat că o reglare descendentă a acestei molecule de aderență a suprafeței celulare și a diferitelor sale variante de îmbinare, semnifică transformarea malignă a epitelilor orale (Kuo și colab., 1998). Colorarea epitelială redusă a CD44 a fost asociată cu proliferarea celulară și activitatea mitotică (Hirvikoski și colab., 1999), în timp ce reglarea pozitivă a unor izoforme precum CD44v9 poate fi implicată în diferențierea țesuturilor (Stoll și colab., 1999). Nicio astfel de legătură între proliferarea celulară și pierderea colorării CD44 nu a putut fi arătată în studiul efectuat de Merne și colab. (2001).

A fost exprimată o altă moleculă de aderență, ICAM-1 în jumătate din șobolanii tratați cu CaOH_2 cu pH 11,2, fără ulceratii orale. Expresia ICAM-1 este asociată cu reacții inflamatorii și leziuni celulare, induse de mediatori inflamatori precum IL-1 și citokina proinflamatorie TNF- α (Patarroyo și Makgoba, 1989). Mai mult, stresul celular poate induce expresia acestei molecule de adeziune în keratinocite. Aceasta poate fi o explicație mai plauzibilă în acest context, deoarece expresia HSP70 a fost, de asemenea, reglată pozitiv la cobai, dar nu a fost prezentă nicio reacție inflamatorie. Într-adevăr, HSP-urile sunt biomarkeri de expunere și leziuni celulare și sunt reglate pozitiv ca răspuns la temperaturi ridicate și stres chimic sau fiziologic (Sens și colab. 1997). Mai mult, expresia crescută a HSP70 s-a găsit și în leziunile orale benigne, displazice și maligne (Sugerman și colab., 1998). HSP-urile au fost analizate în studiul lui Merne și colab. pentru a evalua posibilul răspuns protector la stresul celular datorat tratamentului alcalin. Reglementarea pozitivă a HSP70 a fost văzută mai ales în șobolanii tratați cu $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Această reglare ascendentă poate fi un indicator al rezistenței crescute a mucoasei la leziuni, cum ar fi demonstrată de dependența HSP72 de rezistența mucoasei gastrice la deteriorarea cauzată de administrarea pe termen lung a aspirinei la șobolani (Jin și colab., 1996).

Rezultatele obținute de echipa lui Merne au indicat faptul că mucoasa orală a șobolanilor Long-Evans a rămas relativ neafectată de alcalinitate ridicată, fără modificări morfologice specifice. Pe de altă parte, expunerea pe termen lung la apa alcalină potabilă pare să aibă efecte sistemice profunde manifestate sub forma întârzierii semnificative a creșterii.

7.6. Efectele apei alcalin ionizate asupra reproducerii șoarecilor

Watanabe și Shirai (1990) au raportat faptul că greutatea corporală a cobailor păstrați în aceeași cușcă, trei săptămâni după ce au fost născuți, cărora li s-a administrat ERAW pe parcursul perioadelor de gestație și lactație, a crescut semnificativ în comparație cu cea a martorilor. Kuchida și colab. (1993) au administrat apă alcalină bovinelor și au raportat o schimbare în culoarea cărnii, fiind mai deschisă în nuanță.

Într-un studiu realizat de Watanabe (1995), au fost urmărite efectele apei alcaline asupra femelelor gestaționale, cât și asupra progeniturilor acestora, în urma administrării apei pe perioade bine determinate de timp. Șobolani femele din tulpina Sprague-Dawley, cu greutatea de 182-197g au fost cumpărate la vârsta de 8 săptămâni și adăpostite câte 5 în cuști de plastic cu așchii de lemn drept așternut, alimente și apa de la robinet (TPW) fiind *ad libitum*. După o perioadă de 3 săptămâni de aclimatizare, s-au utilizat exemplarele asupra cărora nu s-au descoperit anomalii de orice natură. Copulația a fost indusă prin plasarea unui șobolan mascul experimentat, din aceeași rasă, într-o cușcă din aluminiu cu 10 femele cu vârsta de peste 12 săptămâni și ciclu estrous regulat, determinat prin frotiuri vaginale anterioare. Un singur șobolan mascul a fost utilizat pe tot parcursul experimentului. Frotiurile au fost studiate zilnic la microscop pentru a confirma copulația. În ziua în care sperma a apărut pe frotiu, femelele au fost separate de mascul și. această zi a fost numită ziua zero a gestației. Toate femelele gestante au fost adăpostite individual în cuști de policarbonat. ERAW a fost administrată ulterior șobolanilor gestanți (grup de testare, n = 10). La probele martor, ziua apariției spermei pe frotiu a fost definită drept ziua zero a gestației, dar TPW a fost administrată ca înainte (grupul de control, n = 10). Femelele copulate au fost împărțite zilnic în grupuri de testare și de control, în esență cu același număr. Șobolanii femele îndepărtați au fost înlocuiți cu femele noi, astfel încât să existe întotdeauna 10 șobolani femele la 1 șobolan mascul.

Timp de 20 de zile, animalelor din grupul de testare li s-a administrat doar ERAW, în timp ce celor de control li s-a administrat TPW *ad libitum*. În a 20-a zi de gestație, animalele au fost autopsiate sub anestezie cu eter și s-au observat diferite organe din regiunile toracice și abdominale în mod general, ovarul și uterul fiind extrase. Folosind aceste ovare, s-a numărat numărul corpurilor galbene, iar pe uterul s-a numărat numărul fetoșilor supraviețuitori, a locurilor de implantare, a embrionilor resorbiți, și numărul fetoșilor morți, din care au fost calculate ulterior rata de implantare și mortalitatea intrauterină. În ceea ce privește fetoșii supraviețuitori, anomalii în forma externă și ale sexului

au fost observate în ansamblu, iar corpul și placenta au fost cântărite cu ajutorul unei balanțe electronice.

Animalelor din grupul de testare li s-au administrat ERAW numai din a 17-a zi de gestație până în a 21-a zi după naștere, în timp ce celor de control li s-a administrat TPW *ad libitum*. Starea generală și de îngrijire a femelelor au fost observate zilnic. Șobolanii gestați, după naștere spontană, au fost observați în ceea ce privește starea lor după naștere, din care au fost calculați indicii de gestație și perioada de gestație. După înțărare la 21 de zile, femelele au fost autopsiate sub anestezie cu eter și s-au observat diferite organe din regiunile toracice și abdominale în ansamblu, iar după extracția uterului, s-a numărat numărul locurilor de implantare.

La momentul nașterii, s-a examinat numărul total de nou-născuți supraviețuitori și morți, sexul și anomalii externe, în timp ce indicii de naștere și indicii de viabilitate s-au calculat în ziua a 4-a după naștere. La patru zile după naștere, numărul a fost ajustat la întâmplare, astfel încât să existe câte 4 masculi și femele, câte 8 descendenți în total și au fost crescuți timp de 21 de zile. În a 21-a zi de lactație, indicii de înțărare a fost calculat. În perioada de lactație și după înțărare, s-au observat separarea auriculei, apariția părului abdominal, erupția incisivilor superiori, deschiderea pleoapelor, coborârea testiculelor și deschiderea orificiului vaginal și alte evoluții morfologice postnatale. TPW a fost furnizat descendenților grupului de testare și matorului după înțărare și observațiile au fost continuate până când s-a putut constata coborârea testiculelor la masculi și deschiderea orificiului vaginal la femele.

După finalizarea tuturor testelor, fetoși și descendenți au fost autopsiați sub anestezie cu eter după cântărire, diferite organe fiind fixate în formalină pentru a pregăti secțiuni histologice după cântărire.

pH-ul, alcalinitatea și concentrațiile de calciu, sodiu, potasiu, magneziu, zinc, fier și clorură au fost măsurate în apa alcalină și cea de la robinet administrate cobailor. Concentrațiile de electroliți, altele decât clorura și fierul în ERAW, au fost mai mari decât în TPW.

Nu s-a observat nicio diferență semnificativă între grupul testat și grupul mator în ceea ce privește greutatea corporală. O creștere semnificativă a aportului de alimente a fost observată de la a 16-a până la a 18-a zi de gestație, iar cea a consumului de apă din a 14-a până la a 18-a zi de gestație în grupul testat în comparație cu matorul.

AKW a fost administrată femelelor din a 17-a zi de gestație până în a 21-a zi după naștere și s-au observat starea de gestație, naștere și starea de alăptare, asupra cărora nefiind găsite rezultate anormale. Comparativ cu matorul, nu s-a observat nicio modificare semnificativă a greutății corporale. Aportul de alimente și apă a crescut semnificativ de la a 7-a zi după naștere

până la a 21-a zi a perioadei de înțarcare în grupul testat. Indicele de gestație a fost de 100% atât în grupul de testare, cât și în cel de control. Perioada de gestație și numărul locurilor de implantare nu au arătat nicio diferență statistică pentru niciunul dintre grupuri.

În plus, mizeria și mirosul din cușcă (datorită utilizării așchiilor de lemn) au fost mult mai reduse pentru animalele din grupul de test comparativ cu martorul.

Nu s-a observat nicio diferență semnificativă nici pentru grupul de test, nici pentru control, referitor la indicele nașterii, indicele de viabilitate și indicele de înțarcare. Cu toate acestea, greutatea corporală medie a descendenților a crescut semnificativ după ce li s-a administrat AKW din a 14-a zi de lactație în cazul masculilor și din a 21-a zi de înțarcare în cazul femelelor. Apariția părului abdominal, erupția incisivilor superiori și deschiderea pleoapelor atât la masculi, cât și la femele, precum și separarea auriculei și coborârea testiculelor la masculi au fost accelerate semnificativ în grupul de test, comparativ cu martorul. Părul progeniturilor din grupul de test a fost mult mai strălucitor și mai voluptos decât cel al controlului, îndeosebi densitatea părului care acoperă corpul fiind remarcată de către autori.

Rezultatele măsurării masei corporale la descendenții născuți din 10 șobolani mame cărora li s-au administrat AKW în timpul gestației și alăptării au indicat o creștere semnificativă atât în cazul masculilor, cât și a cel al femelelor, comparativ cu valoarea corespunzătoare la descendenții născuți de la mame cărora li s-a administrat TPW. Mai mult, evoluțiile morfologice postnatale la masculi și femele au fost accelerate semnificativ. Acest lucru poate fi explicat după cum urmează. AKW este produsă de mișcarea cationilor din TPW către catod în electroliză. Cantitatea de ioni transferată depinde de cantitatea de electroliți, de pH și de debit. Toți cationii sunt transferați în apă alcalină, măbind considerabil cantitatea totală de cationi din AKW. Alcalinitatea crescută a AKW în comparație cu cea a TPW poate susține o astfel de ipoteză. În consecință, AKW administrat unei femele conține o concentrație mai mare de cationi. Acest lucru este în acord cu măsurarea efectivă a electroliților în AKW și TPW. Deoarece majoritatea cationilor transferați la AKW sunt hidratați cu o moleculă de apă prin electroliză, aceștia sunt absorbiți rapid și ușor utilizați ca formă activă fiziologic, pH-ul AKW ajustat la 9,0 în momentul electrolizei TPW fiind măsurat la 8,7 de către Asociația Japoneză de Igienă Alimentară.

Aportul de alimente și apă al femelelor care au primit AKW începând cu data la care sperma a fost observată pe frotiu până în a 20-a zi de gestație a crescut semnificativ în comparație cu cel al controalelor în ultima jumătate a perioadei de gestație. Cu toate acestea, nu s-a observat nicio diferență

semnificativă între grupul de testare și cel de control în ceea ce privește modificările în greutatea corporală a femelelor până în a 20-a zi de gestație, supraviețuirea fetușilor extrași în a 20-a zi de gestație, precum și greutatea acestora și a placentei. În ceea ce privește diferitele organe din regiunile toracice și abdominale ale șobolanilor gestaționali și forma externă a fetușilor, nu s-a observat nicio anomalie macroscopică.

Aportul de alimente și apă în ceea ce privește femelele grupului de test cărora li s-a administrat AKW din a 17-a zi de gestație până la momentul înțărării a crescut semnificativ în comparație cu controlul începând cu a 7-a zi de lactație. Cu toate acestea, modificările greutății corporale la șobolanii gestaționali și lactanți, indicele de gestație, perioada de gestație, raportul de sex, indicele de naștere, indicele de viabilitate și indicele de înțarcare s-au situat în intervalul rezultatelor deja raportate (Kaneko și colab. al., 1993), care nu prezintă nicio diferență semnificativă în comparație cu cea a matorului.

Pe de altă parte, apariția părului abdominal, erupția incisivilor superiori, deschiderea pleoapelor, separarea auriculei și coborârea testiculelor și alte dezvoltări morfologice postnatale la descendenții născuți din femelele cărora li s-a administrat AKW în perioada de lactație și după înțarcare, s-au remarcat semnificativ mai devreme în comparație cu controlul. Aparițiile anterioare ale acestor modificări au fost confirmate consultând tabelul de timp al dezvoltărilor morfologice postnatale raportate de Ninomiya și colab. (1989) și Shiota și colab. (1993) folosind același tip de cobai. Mai mult, greutatea corporală a descendenților din grupul testat a crescut semnificativ începând din a doua jumătate a perioadei de lactație. Greutatea corporală crescută dintre descendenți a fost în concordanță cu raportul anterior al lui Watanabe și Shirai (1990), care descrie că greutatea corporală a unui descendent la 3 săptămâni după naștere, când mamele lor au primit AKW de la data gestației până la momentul înțărării, au crescut semnificativ în comparație cu controlul.

De asemenea, creșterea greutății corporale a descendenților, totuși, poate apărea fie prin transferul placentar către făt, de cationi hidratați cu apă produși prin electroliză sau prin suplimentarea nutrițională prin laptele matern până la 3 săptămâni după naștere. În prezent nu este clar dacă creșterea greutății corporale a descendenților a fost cauzată de creșterea producției și secreției de lapte de către glanda mamară și îmbunătățirea calității laptelui ca răspuns la aprovizionarea cu AKW cu un conținut ridicat de cationi sau o creștere patologică a greutății corporale indusă de furnizarea de AKW mamelor în timpul gestației și alăptării. Creșterea greutății corporale a descendenților este suficient de importantă pentru a merita un studiu suplimentar. Mai mult decât atât, creșterea semnificativă a aportului de

alimente și apă în grupul de testare al femelelor este o altă întrebare care a rămas fără răspuns.

8. Efectele anti-îmbătrânire ale apei alcaline

Studiile timpurii pe modele animale au raportat că suplimentarea cu apă alcalină poate exercita efecte pozitive asupra îmbunătățirii greutății corporale și a dezvoltării la descendenți (Watanabe, 1995). Mai mult decât atât, markerii biochimici au fost analizați, sugerând că aportul de apă ionizată alcalină poate determina creșterea activității metabolice. În special, hiperkaliemia a fost observată la șobolanii de 15 săptămâni și s-au constatat modificări patologice la nivelul mușchiului miocardic (Watanabe și colab., 1997).

Au fost efectuate studii asupra apei alcalin ionizate (ERAW), referindu-se la apa electrolizată produsă din minerale, cum ar fi magneziu și calciu, care se caracterizează prin hidrogen suprasaturat, pH ridicat și un potențial redox negativ. Această apă funcțională bogată în hidrogen a fost introdusă ca strategie terapeutică pentru promovarea sănătății și prevenirea bolilor (Jin și colab., 2006).

S-a demonstrat că apa alcalin electrolizată exercită un efect supresiv asupra nivelurilor de radicali liberi din organismele vii, rezultând astfel prevenirea bolilor (Hanaoka și colab., 2004). Au fost documentate diferite efecte biologice, cum ar fi acțiunile antidiabetice și antioxidante (Jin și colab., 2006), efectele de protecție a ADN-ului (Shirahata și colab., 1997) și activitățile de stimulare a creșterii (Watanabe, 1995).

Deși au fost raportate o varietate de funcții bioactive, efectul apei alcaline asupra duratei de viață și longevității *in vivo* este încă necunoscut. S-a dovedit că alcalinizarea animalelor este bine tolerată și crește răspunsul tumoral la chimioterapia metronomică, precum și calitatea vieții la animalele de companie cu cancer avansat (Spugnini și colab., 2014).

Magro și colab. au realizat în anul 2016 un studiu bazat pe experimente de rată de supraviețuire, care joacă un rol central în cercetarea privind îmbătrânirea, efectuate pentru a evalua dacă intervențiile specifice pot modifica procesul de îmbătrânire și durata de viață la modelele animale. Efectele biologice ale apei alcaline au fost evaluate pe o populație selectată de 150 de șoareci. Șoarecii lipsiți de patogeni au fost cumpărați și plasați într-o instalație de reproducere specifică, izolați de contactul cu alte animale sau cu îngrijitorii. Populația a fost împărțită în 3 grupuri, fiecare format din 50 de indivizi, după cum urmează:

- grupa A: 50 șoareci hrăniți și adăpați în mod convențional cu apă alcalină produsă de ionizatorul de apă (dispozitiv de tratare la domiciliu pentru producerea apei alcaline de băut);
- grupa B: 50 de șoareci hrăniți și adăpați în mod convențional cu apă alcalinizată obținută prin diluarea unei soluții alcaline concentrate;
- grupa C: (grup de control) 50 de șoareci hrăniți în mod convențional și adăpați convențional cu apă de la robinet. Aprovizionarea cu apă locală a fost evaluată săptămânal pentru a asigura absența toxinelor și a agenților patogeni. Valorile pH-ului au fost situate în intervalul 6,0-6,5.

Șoarecii în vârstă tratați au fost autopsiați postmortem și supuși examenului histologic. Animalele aparținând populațiilor tratate cu apă alcalină, A și B, au fost sacrificate după 24 de luni și comparate cu șoarecii tratați cu apă de la robinet. Probe din rinichi, intestin, inimă, ficat și creier au fost prelevate și secțiunile obținute au fost analizate prin microscopie optică.

Pentru a investiga influența biologică a apei alcaline asupra longevității șoarecilor, a fost folosit modelul de timp de eșec accelerat (AFT) (Collett și colab., 2014). Relevanța modelului AFT pentru studiile biomedicale a fost deja recunoscută în literatură (Collett și colab., 2014). Cu o referință mai specifică la problema îmbătrânirii, Swindell a observat că unele manipulări genetice au avut un efect multiplicativ asupra supraviețuirii, care au fost bine caracterizate de modelul AFT „al factorului de decelerare”. Mai mult decât atât, acesta a susținut, de asemenea, că modelul AFT ar trebui să fie utilizat mai larg în cercetările privind îmbătrânirea, deoarece oferă instrumente utile pentru a maximiza rezultatele obținute din studiile experimentale de supraviețuire a șoarecilor. Experimentul a constatat într-o perioadă inițială de aclimatizare de 15 zile. După aclimatizare, animalele din grupul A au fost adăpate cu apă alcalină (pH 8,5), obținută cu ajutorul ionizatorului de apă (Asiagem, Italia), în timp ce animalele din grupul B au fost tratate cu apă alcalinizată la pH 8,5 de către o soluție alcalină concentrată (AlkaWater by Asiagem, Italia) timp de 15 zile. Animalele din grupul C, grupul de control, au fost adăpate cu apă provenită din rețeaua de alimentare locală. Această perioadă a fost identificată pentru a obișnui treptat animalele cu apa alcalină. La sfârșitul celei de-a doua perioade de aclimatizare, animalele din grupele A și B au fost tratate cu apă alcalină cu pH 9,5 (de către Water Ionizer și de AlkaWater de către Asiagem, Italia), în timp ce animalele din grupul C au fost adăpate cu apă de la robinet.

După primul an, cei mai agresivi indivizi au fost mutați în alte cuști aparținând aceluiași grup și a fost utilizat un protocol de îmbogățire a mediului înconjurător pentru a scădea hiperactivitatea. Acest fenomen a fost observat mai ales la animalele din grupele A și B. Începând cu al doilea an de viață șoarecii tratați cu apă alcalină au copleșit martorii.

Începând cu al doilea an de viață, este de remarcat faptul că ambele grupuri tratate cu apă alcalină denotă o scădere în curba de pericol de-a lungul timpului, în timp ce curba corespunzătoare pentru grupul de control crește monoton. Pentru a compara mai formal nivelurile de tratament, analiza propusă a oferit, de asemenea, o evaluare p adecvată, putându-se afirma că există suficiente dovezi experimentale pentru a concluziona că tratamentul afectează în mod semnificativ longevitatea șoarecilor. În special apa alcalină oferă un beneficiu longevității în ceea ce privește „factorul de decelerare a îmbătrânirii”, deoarece scade funcțiile de pericol în comparație cu grupul de control.

Nu au fost raportate diferențe semnificative reieșite din examenul histologic în rândul celor trei grupuri. În toate probele examinate, țesutul renal a fost caracterizat de un infiltrat limfoplasmatic interstitial ușor până la moderat și de puține modificări glomerulare ocazionale ca reducere a dimensiunii glomerulare și creșterea spațiului Bowman. Diagnosticul final a fost nefropatie cronică progresivă ușoară pentru cele trei grupuri de șoareci analizați.

Examinarea microscopică a ficatului a relevat un model nodular multifocal al parenchimului și degenerare hidropică citoplasmatică hepatocelulară ușoară până la moderată cu binucleație multifocală la toate animalele explorate (Figura 4 (B)).

Anisocarioza ușoară până la moderată a fost cea mai relevantă alterare, cu puțini nuclei pleomorfi și pseudoincluziuni intranucleare frecvente și cariomegalie. Un infiltrat perivascular slab specific a fost prezent ocazional. În final, diagnosticul a fost hepatopatie difuză ușoară până la moderată cu hiperplazie hiperplazică multifocală (Figura 4(A)).

Parenchimul pulmonar a arătat zone multifocale de ușoară îngroșare interstițială a septurilor interalveolare datorate congestiei moderate și infiltratului celular slab, mixt. Au fost detectate zone ușoare de emfizem la periferia parenchimului. Diagnosticul final a fost atelectazie multifocală foarte ușoară și emfizem vicariant ușor (Figura 5 (A)).

În același timp, nu s-au observat modificări histologice histopatologice relevante la nivelul intestinului, creierului și a inimii (Figura 5 (B)).

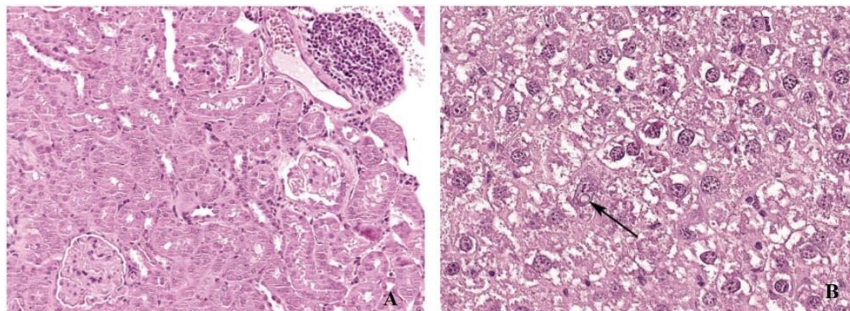


FIG. 4. Probe analizate microscopic, prelevate din rinichi (A) și ficat (B). În cazul rinichiului sunt evidențiate nefropatia cronică specifică, infiltratul interstițial limfocitar (vertical) și un glomerul sclerotic (dreapta mijloc). În cazul ficatului, se observă modificări cauzate de îmbătrânirea celulelor (preluat după Magro și colab., 2016).

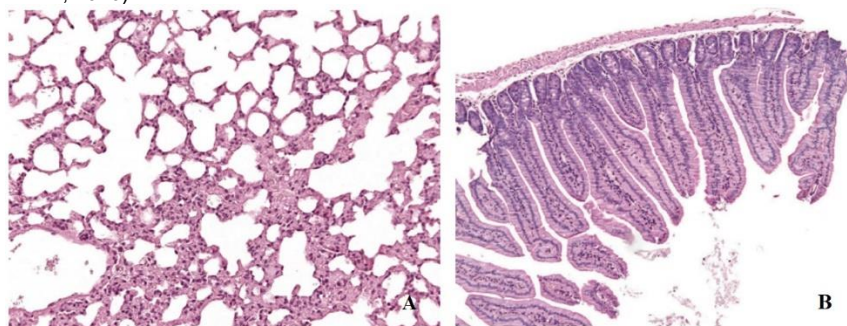


FIG. 5. Probe analizate microscopic, prelevate din plămâni (A) și intestin (B). În cazul plămânului se observă atelectazie ușoară și îngroșarea interstițială multifocală nesemnificativă a septurilor alveolare asociată cu congestie și creștere celulară ușoară. În cazul intestinului, în secțiunea longitudinală duodenală sunt evidențiate vilozități uniforme, subțiri și alungite (preluat după Magro și colab., 2016).

Analiza statistică a datelor de supraviețuire indică posibilitatea unui efect pozitiv al apei alcaline asupra duratei de viață a șoarecilor, iar modelul AFT a permis evaluarea diferențelor începând cu al doilea an al curbelor de supraviețuire. Aceste rezultate oferă un rezumat informativ și cantitativ al datelor de supraviețuire ca funcție a tratamentului cu apă alcalină pe modele de șoareci cu viață lungă. Observarea țesuturilor animalelor decedate a fost efectuată pentru evaluarea stării organelor interne pentru a fi comparată cu analize similare ale animalelor netratate. Leziunile renale observate în urma analizelor histologice au fost specifice și frecvente pentru cele trei grupuri de animale. Nefropatia cronică progresivă a fost bine descrisă ca schimbare normală a îmbătrânirii la șoareci (McInnes, 2012).

Ficatul examinat a fost afectat și de leziunile tipice ale subiecților maturi, cum ar fi nodulii hiperplazici. Mai mult, modificările cunoscute ale

îmbătrânirii au fost identificate în hepatocite, cum ar fi cariomegalie, pleomorfism nuclear și chisturi cu pseudoincluziuni (McInnes, 2012).

Din punct de vedere al efectelor anti-îmbătrânire ale apei alcaline, Logozzi și colab. au realizat în anul 2020 un studiu *in vivo* asupra șoarecilor. Scopul acestui studiu a fost de a investiga un rol potențial al apei alcaline în îmbunătățirea semnăturii moleculare a îmbătrânirii, cum ar fi activitatea telomerazei și lungimea telomerilor, în concordanță cu inducerea unui răspuns antioxidant sistemic. Literatura anterioară susținea cu tărie o patogeneză multifactorială conceptuală a îmbătrânirii, incluzând factori predeterminați și factori asociați daunelor (Jin, 2010). Mai mult, un spectru larg de boli a fost legat de îmbătrânire, inclusiv tumori și boli neurodegenerative (Shay și Wright, 2019).

Din punct de vedere molecular, structurile care sunt direct implicate în îmbătrânirea celulară sunt telomerii (Aubert și Lansdorp, 2008). Telomerii sunt regiuni de ADN cu un grad ridicat de replicare, situați la fiecare capăt al cromozomilor, care protejează aceste regiuni de recombinare, degradare și fuziune inter-cromozomială (Shammas, 2011). Telomerii mamiferelor sunt compuși din repetări în tandem ale secvențelor TTAGGG asociate cu șase complexe proteice cu scop în apărare, specifice telomerilor, care protejează capetele cromozomilor (Shay și Wright, 2019). Astfel, toate investigațiile care vizează observarea procesului de îmbătrânire din punct de vedere molecular au măsurat atât activitatea telomerazei (enzima implicată direct în alungirea telomerilor), cât și lungimea telomerilor (Forero și colab., 2016).

Cu toate acestea, deși pare clar până în prezent că scurtarea telomerilor este o dovadă moleculară a unei îmbătrâniri progresive la nivel celular, există insuficiente informații cu privire la mecanismele care pot duce la acest proces aparent de neoprit (Cefalu, 2011). Unele dovezi recente sugerează mai întâi că acumularea progresivă de toxine, cum ar fi oxidanții, în corpul uman poate accelera îmbătrânirea la nivel celular (Kirkwood și Kowald, 2012). Astfel, o modalitate posibilă de a face față îmbătrânirii este de a reduce producția de oxidanți și acumularea ulterioară a acestora în țesuturi. Desigur, acest lucru pare ușor de conceput și rezonabil; cu toate acestea, până în prezent nu s-au putut aduna resursele necesare pentru a se putea încerca o strategie anti-oxidantă fezabilă (Sadowska-Baetosz și Bartosz, 2014).

Una dintre cele mai importante cerințe pentru corpul uman este apa. Apa este una dintre cerințele esențiale pentru viață pe care organismul nu le produce (adică nu există gene care codifică producerea apei în organism) (Hooper și colab., 2014). Pe de altă parte, acesta este suficient de rezistent pentru a lucra chiar și cu un aport scăzut de apă. Este deja cunoscut faptul că, independent de sex, persoanele în vârstă obișnuiesc să aibă aproximativ

jumătate din procentul cantității de apă din corp în comparație cu cel al nou-născuților și acest lucru se datorează probabil și faptului că beau mai puțină apă (Hooper și colab., 2014).

A fost raportat faptul că lungimea telomerilor poate fi puternic influențată de variația pH-ului microambiental (Ge și colab., 2016). De fapt, telomeraza umană poate fi indusă să extindă selectiv telomerii scurți prin expunerea la pH scăzut – 6,8 (Ge și colab., 2016). Este bine cunoscut faptul că micromediul tumorilor maligne este acid și alcalinizarea micromediului tumoral afectează foarte mult creșterea și progresia tumorii (Pillai și colab., 2019). Acidificarea țesuturilor este, de asemenea, o caracteristică metabolică a diabetului de tip II (Gillies și colab., 2019). De interes sunt telomerii mai scurți, dar nu lungimea medie a telomerilor, care sunt legați de viabilitatea celulară redusă și de senescentă (Hemann și colab., 2001). De fapt, scurtarea telomerilor declanșează un răspuns de deteriorare a ADN-ului, ducând inevitabil la apoptoză celulară sau senescentă (Shay și Wright, 2019). Nivelurile scăzute de telomereză, de exemplu datorită pH-ului extracelular scăzut, sunt legate de telomerii scurți, o afecțiune critică care se termină rapid cu moartea celulară și îmbătrânirea organismului (Ge și colab., 2016).

În timp ce un rol critic al telomerilor în cancer și îmbătrânire pare clar, mecanismele care *in vivo* pot influența telomerii, fie scurtarea, fie prelungirea acestora, nu sunt suficient explorate (Aunan și colab., 2017). O ipoteză sugerează că prelungirea telomerilor este reglementată de recrutarea preferențială a telomerasei la telomerii scurți; o altă ipoteză sugerează că telomeraza există într-o stare inactivă sau activă și că este inactivă pe telomerii lungi și activă pe telomerii scurți (Teixeira și colab., 2004). Ambele ipoteze nu par reciproc excluzive și, mai ales, nu este cunoscut dacă se poate să fie mai operativ în timpul îmbătrânirii normale și celălalt în favorizarea bolilor precum cancerul.

Într-o investigație anterioară, s-a arătat că tratamentul oral cu papaya fermentată (FPP) induce o inhibare clară a creșterii tumorii pe un model de melanom foarte agresiv; acest rezultat a fost în concordanță cu o scădere a speciilor reactive de oxigen (ROS) și o creștere a moleculelor naturale anti-oxidante, cum ar fi SOD-1 și glutathionul în sângele șoarecilor tratați (Logozzi și colab., 2019). S-a raportat că, *in vivo*, administrarea de apă alcalină a indus o întârziere a îmbătrânirii șoarecilor (Magro și colab., 2016), susținând un rol-cheie al apei alcaline în cel puțin încetinirea procesului de îmbătrânire.

Mai mult decât atât, există unele molecule care s-au dovedit a fi importante în multe procese legate de îmbătrânire (de exemplu acidul boric, clorura de potasiu, clorura de sodiu, hidroxidul de potasiu, molibdatul de sodiu dihidrat, selenitul de sodiu). În special, borul, molibdenul și seleniul exercită

funcții semnificative în procesele metabolice umane. Borul este un element esențial în multe căi metabolice ale oamenilor și animalelor (Ulusik și colab., 2018). Borul este implicat în inducerea unui răspuns antioxidant împotriva ROS (Ulusik și colab., 2018), în metabolismul calciului și, în consecință, în creșterea oaselor (Nielsen, 2000), cu un rol potențial în pierderea osoasă a perioadei post-menopauză (Gallardo-Williams și colab., 2003). Molibdenul este un oligoelement esențial în majoritatea organismelor cu un rol cheie în speranța de viață (Schwarz și colab., 2013). Enzimele care conțin molibden, folosind apa ca donator sau acceptor de oxigen, catalizează oxidarea și uneori reducerea moleculelor mici în metabolismul azotului, sulfului și carbonului (Kisker și colab., 1998). Deficiențele de molibden sunt asociate cu cancerul esofagian (Nouri și colab., 2008), cu niveluri ridicate de sulfat și uree și cu leziuni neurologice (Smolinsky și colab., 2008). Seleniul este un oligoelement esențial conținut în mod natural în multe alimente, inclusiv pește, carne, lapte și derivați, în drojdia de bere, cereale, nuci, ciuperci, fructe și legume (Aguilar și colab., 2008). Seleniul este o cerință esențială pentru un spectru larg de activități metabolice, datorită activității sale antioxidante (Wang și colab., 2017). Bolile metabolice precum hiperglicemia, hiperlipidemia și hiperfenilalaninemia sunt caracterizate de deficiența de seleniu, în timp ce suplimentarea cu seleniu este asociată cu efecte benefice în ateroscleroză, hipercolesterolemie, diabet zaharat de tip I și fenilketonurie (Wang și colab., 2017).

Apa utilizată în studiul descris de Logozzi și colab. a fost obținută adăugând cinci picături de AlkaWater® în 250 ml apă de la robinet, până la pH 9,0, conștient din acid boric, apă distilată, clorură de potasiu, clorură de sodiu, hidroxid de potasiu, molibdat de sodiu dihidrat și selenit de sodiu.

ERAW a fost administrată pe cale orală șoarecilor la un volum de 250 ml/kg/șoarece (5 ml/șoarece) în fiecare zi fără întrerupere, corespunzător concentrației de 215 mg/kg/șoarece/zi (3,6 μ L/șoarece/zi) din AlkaWater®. Tratamentul zilnic al șoarecilor cu ERAW a început 2 săptămâni după ce șoarecii au ajuns la 6 săptămâni de viață și au continuat timp de 10 luni până la sacrificarea acestora (51 săptămâni de viață).

20 șoareci femele C57BL/6J între 16 și 20 g (4 săptămâni de viață) au fost achiziționate de la Charles River Laboratories Italia s.r.l., (Calco, Lecco, Italia) și găzduite în unitatea veterinară a Institutului Național de Sănătate din Italia. Șoarecii au avut perioade de 10 și 14 ore de lumină și respectiv, întuneric, au fost adăpostiți într-un număr diferit de cuști de animale, în funcție de experiment, cu mâncare *ad libitum* și apă furnizată printr-o sticlă. Șoarecii au fost verificați de două ori pe săptămână de către un medic veterinar responsabil cu monitorizarea bunăstării animalelor pentru semne de suferință,

cum ar fi pierderea în greutate, scăderea consumului de apă și alimente, stratul de păr, nivelurile de activitate scăzute în conformitate cu liniile directoare pentru o practică corectă de laborator și semne de calitate proastă a vieții. Punctul final a fost la 11 luni pentru a evalua parametrii de îmbătrânire. Șoarecii au fost împărțiți în două grupuri: un grup de control (grup CTR, grup netratat) și un grup de tratament (grup ERAW). Fiecare grup a fost format din 10 animale. Grupul CTR a primit apă de la robinet (pH = 7) în fiecare zi, în timp ce grupul ERAW a fost tratat cu apă alcalină (pH = 9.0) în fiecare zi fără întrerupere, până la sacrificarea animalelor. Chiar înainte de sacrificarea șoarecilor, sângele a fost scos din ochii acestora. Imediat după sacrificare, măduva osoasă a fost izolată atât din tibii, cât și din femurele membrelor posterioare, în timp ce ovarele au fost recuperate din sistemul reproducător. Sângele, celulele măduvei osoase și celulele germinale ovariene au fost utilizate pentru analiza experimentală ulterioară a parametrilor de îmbătrânire.

Obiectivul studiului a fost evaluarea efectelor anti-îmbătrânire ale ERAW asupra șoarecilor femele C57BL/6J. A fost începută în mod intenționat tratarea șoarecilor de la vârsta de 6 săptămâni (corespunzătoare vârstei de 13 ani) până la vârsta de 11 luni (corespunzătoare vârstei de 41 de ani). În comparația șoarecilor cu oamenii, este știut faptul că ciclul uman începe în jurul vârstei de 13 ani și se termină în jurul vârstei de 45 de ani, cu o fertilitate maximă între 20 și 38 de ani (Schuiling și Likis, 2013), în timp ce fertilitatea șoarecilor C57BL începe în jurul vârstei de 4 - 7 săptămâni și care se termină la vârsta de 12 luni (Franks și Payne, 1970). Prin urmare, prin analogie, a fost aleasă fereastra de timp între 6 săptămâni și 11 luni a perioadei de viață a cobailor pentru a evalua efectul anti-îmbătrânire al ERAW în timpul unei perioade stabilite de vârstă fertilă a șoarecilor pe deplin comparabilă cu aceeași perioadă a femeilor umane.

Recoltarea probelor de sânge de la șoarecii CTR și ERAW a fost efectuată prin sângerare retro-orbitală (ROB) imediat înainte de sacrificiu. Această tehnică de flebotomie sigură a permis obținerea de probe de înaltă calitate, cu un volum adecvat (500 μ l/șoarece) pentru analize suplimentare (Sharma și colab., 2014). Probele de plasmă (250 μ l/șoarece) au fost apoi colectate și imediat analizate sau stocate la -80°C până la analiză.

Imediat după sacrificarea șoarecilor CTR și ERAW, măduva osoasă a fost obținută atât din tibii, cât și din femurele picioarelor posterioare ale șoarecilor (Amed și colab., 2016) și plasate în soluție fiziologică (NaCl), celulele fiind separate și transformate într-o suspensie unicelulară uniformă. Suspensiile monocelulare au fost spălate de două ori în PBS și prelucrate imediat pentru următoarea analiză.

Totodată, ovarele au fost disecate din sistemul reproducător (Duselis și Vrana, 2007) și plasate în soluție fiziologică (NaCl) cu 1% tripsină și 0,1 μ M din EDTA. Celulele germinale ovariene au fost izolate, obținându-se o suspensie uniformă unicelulară din țesutul ovarian. Suspensiile monocelulare au fost spălate de două ori în PBS și prelucrate imediat pentru următoarea analiză.

Determinarea cantitativă a concentrațiilor de telomerază murină, analiza nivelurilor totale de ROS, detectarea și cuantificarea nivelurilor totale de glutatation (GSH), cât și determinarea și cuantificarea activității de superoxid-dismutază au fost efectuate în preparatele din plasmă obținute de la șoarecii CTR și ERAW.

Detectarea telomerilor a fost efectuată în celulele măduvei osoase și în celulele germinale ovariene ale șoarecilor CTR și ERAW.

S-a observat o creștere a concentrației de telomerază în plasma șoarecilor tratați zilnic cu ERAW, în comparație cu șoarecii care beau apă netratată (grupul CTR). În special, cantitatea telomerazei a fost $75,5 \pm 5,1$ ng/mL în grupul de studiu comparativ cu $56,0 \pm 5,2$ ng/mL din grupul de control. Acest set de rezultate a arătat că un aport zilnic de ERAW după 10 luni de tratament a indus o creștere semnificativă a nivelului de telomerază din sânge (concentrații crescute de 1,4 ori ale enzimei în grupul ERAW în comparație cu grupul CTR).

Celulele măduvei osoase au fost semnificativ crescute, de 3 ori mai mari în grupul ERAW în comparație cu grupul CTR. Rezultatele analizei lungimii telomerilor, obținute prin citometrie în flux utilizând o sursă de lumină cu excitație la 488 nm au arătat că lungimea acestora a fost semnificativ mai mare (de 4 ori) la șoarecii tratați cu ERAW în comparație cu șoarecii martori. A fost investigat și efectul ERAW asupra lungimii telomerilor și în celulele germinale ovariene. Comparativ cu celulele măduvei osoase, celulele germinale ovariene au fost crescute semnificativ (de 1,3 ori) în grupul ERAW în comparație cu grupul CTR. Când a fost analizată lungimea telomerilor, rezultatele au arătat că telomerii au fost semnificativ mai lungi (de 2 ori) în celulele germinale ovariene ale șoarecilor ERAW în comparație cu șoarecii CTR.

Pentru a evalua răspunsul sistemic anti-oxidant al tratamentului cu apă alcalină, a fost analizat echilibrul redox al șoarecilor tratați comparativ cu șoarecii netratați. În acest scop, au fost măsurate nivelurile totale de ROS în probele de plasmă din ambele grupuri (Logozzi și colab., 2019). Rezultatele au arătat că ERAW a indus o scădere semnificativă în nivelurile ROS din sânge comparativ cu grupul CTR.

Au fost, de asemenea evaluate nivelurile sanguine ale antioxidantilor naturali, cum ar fi glutatationul liber (GSH) și enzima superoxid dismutază-1

(SOD-1). Rezultatele au arătat o diferență semnificativă în nivelurile GSH dintre cele două grupuri, cu cele mai ridicate niveluri de GSH în probele de plasmă din grupul ERAW în comparație cu grupul CTR. Rezultate similare s-au obținut cu nivelurile sanguine SOD-1 care au fost semnificativ mai mari în grupul ERAW în comparație cu grupul CTR. Acest set de rezultate a arătat că aportul de ERAW cu o durată de 10 luni a dus la creșterea nivelului plasmatic de antioxidanți naturali, cu o reducere consistentă a nivelurilor de ROS, asistând la un control stabil al echilibrului redox.

Rezultatele experimentului realizat de Logozzi și colab. au arătat că un aport zilnic de ERAW a avut un efect anti-îmbătrânire clar, demonstrat de creșterea atât a activității telomerasei, cât și a lungimii telomerilor, împreună cu o reducere semnificativă a nivelurilor sanguine de ROS, cu o creștere consistentă atât a nivelurilor de GSH, cât și de SOD-1. Acest răspuns la apa alcalină, atât la nivel sistemic, cât și la nivel de organ a fost, de asemenea, consecvent cu o celularitate crescută atât în măduva osoasă, cât și în ovare. Aceste rezultate au susținut un rol critic al ERAW în reducerea deteriorării ADN-ului în întregul corp, printr-o prevenire clară a oxidării crescute la nivel celular și sistemic. Datele au fost în concordanță cu un alt studiu, în care apa alcalină a avut un efect redus asupra nivelurilor de enzime antioxidante din organism. De fapt, apa alcalină eliberează enzime antioxidante puternice precum SOD într-un mod în care pot contracara direct producția și acumularea în țesuturi a radicalilor liberi în întregul corp (Abraham și Flebas., 2011).

S-a demonstrat faptul că ERAW, suplimentată cu o serie de elemente esențiale, poate avea un rol în îmbunătățirea sau cel puțin întârzierea procesului de îmbătrânire. Fiecare dintre elementele esențiale poate contribui direct la efectele demonstrate prin tratamentul cu apa alcalină. Cu toate acestea, într-o lucrare anterioară, alcalinitatea propriu-zisă a apei a contribuit la îmbunătățirea supraviețuirii șoarecilor tratați în comparație cu șoarecii martor (Magro și colab., 2016).

Cu toate acestea, unele lucrări anterioare au arătat că alcalinizarea apei poate fi utilă atât în prevenirea (Astigiano și colab., 2017) și tratarea cancerelor, în combinație cu chimioterapia (Spugnini și colab., 2014), atât în modele murine, cât și la animalele de companie cu tumori spontane. În măsura în care știm despre cancer faptul că acesta suferă de un pH scăzut la nivel microambiental, ambele lucrări au susținut utilizarea alcalinizării apei în implementarea terapiilor existente (Pillai și colab., 2019).

Acest studiu realizat de Logozzi și colab. a fost primul care arată că tratamentul cu ERAW îmbunătățește semnificativ procesul de îmbătrânire la nivel molecular. În fapt, aceștia au arătat faptul că ERAW a indus o creștere de 3 ori mai mare atât a activității telomerasei în sânge cât și a lungimii telomerilor

în măduva osoasă și ovarele șoarecilor tratați. Acest lucru a fost în concordanță cu un răspuns puternic anti-oxidant la nivel sistemic, așa cum am arătat anterior prin utilizarea unui compus puternic anti-oxidant, cum ar fi papaya fermentată, în tratarea șoarecilor afectați de un melanom (Logozzi și colab., 2019). Ansamblul acestor rezultate sugerează că un aport zilnic de ERAW poate fi util atât în îmbunătățirea procesului de îmbătrânire, cât și în reducerea apariției tumorilor legate de îmbătrânire la persoanele în vârstă, independent de orice alt factor, inclusiv de gen. Cu toate acestea, s-a demonstrat, de asemenea, că în acest model de îmbătrânire a femelelor, tratamentul cu ERAW a indus o creștere a celularității în ovarele șoarecilor tratați, sugerând un efect care poate implica o fertilitate prelungită, trebuind însă investigat cu experimente dedicate.

O recenzie recentă sugerează că un control al echilibrului pH-ului în corpul uman poate fi util în reducerea nivelului de dominanță bacteriană în compartimentele în care există coabitarea constitutivă între bacterii și celulele noastre epiteliale (de exemplu, intestinul) (Albina și colab., 2019). Acest lucru, la rândul său, sugerează că un aport zilnic de ERAW poate fi esențial pentru a evita creșterea excesivă a bacteriilor în timpul vieții. La femele, aportul de apă și, poate, de apă alcalină este esențial, întrucât apa este indispensabilă pentru funcționarea deplină a mecanismelor naturale de tamponare (de exemplu, producția de HCO_3). O lucrare mai veche a prezentat faptul că, deși acidificarea întârzie apariția osteoporozei (Barzel, 1975), o afecțiune legată de vârstă a femeilor, a sugerat la rândul său că consumul de apă alcalină este o modalitate cheie de reducere a osteoporozei la femei. Un studiu clinic mai recent a arătat că administrarea zilnică de bicarbonat de potasiu la femeile aflate post-menopauză a indus remineralizarea osoasă (Sebastian și colab., 1994), susținând în continuare un rol critic al apei alcaline pentru sănătatea ființelor umane.

Rezultatele obținute de echipa lui Logozzi arată că un consum zilnic de ERAW, induce:

- un efect antioxidant sistemic;
- o creștere atât a activității telomerazei, cât și a lungimii telomerilor (adică o întârziere a procesului de îmbătrânire);
- o celularitate crescută atât în măduva osoasă, cât și în ovarele șoarecilor tratați.

Toate acestea sunt fenomene care pot contribui la reducerea apariției tumorilor legate de îmbătrânire la persoanele în vârstă, prelungesc perioada de fertilitate și prelungesc și îmbunătățesc calitatea vieții, prin consumul propriu-zis a unei cantități substanțiale de apă alcalină.

9. Efectul pH-ului apei potabile asupra microbiotei intestinului uman și asupra reglării glucozei

Incidența diabetului de tip 2 (T2D) este în continuă creștere și se estimează că 592 de milioane de oameni din întreaga lume vor fi afectați de această boală până în 2035, ceea ce face din T2D o provocare majoră pentru sănătatea publică (Guariguata și colab., 2014). Caracteristica esențială a T2D este hiperglicemia cauzată de rezistența la insulină hepatică și periferică, însoțită de disfuncția progresivă a celulelor beta. Cu toate acestea, etiologic și fiziopatologic, T2D este o tulburare eterogenă cu numeroși factori genetici și ecologici care cresc riscul dezvoltării fenotipului diabetic. Printre factorii de mediu, variabilele legate de stilul de viață, cum ar fi inactivitatea fizică și regimul alimentar dens, au fost recunoscute ca factori determinanți importanți ai dezvoltării T2D. Au fost identificați recent alți factori de risc potențial modificabili, inclusiv disbioza microbiotei intestinale (Karlsson și colab., 2013) și încărcătura acidă a dietei (Fagherazzi și colab., 2013).

S-a demonstrat faptul că scăderea experimentală a pH-ului sanguin în limitele normale reduce sensibilitatea la insulină (DeFronzo și Beckles, 1979). O dietă bogată în alimente acidogene poate induce dezechilibru acido-bazic al întregului organism sub formă de acidoză metabolică de grad scăzut (Frassetto și colab., 1998), iar markerii acidozei induse de dietă au fost asociați cu rezistența la insulină (Maalouf și colab., 2007). Este de reținut faptul că, într-un studiu recent realizat pe 66 485 de femei de vârstă mijlocie, aciditatea din dietă a prezis incidența T2D pe o perioadă de 14 ani, independent de alți factori de risc cunoscuți (Fagherazzi și colab., 2013), rezultat ce a fost coroborat independent într-un studiu pe 120 053 americani (Kieffe-de Jong și colab., 2017).

În timp ce rapoartele timpurii de disbioză la pacienții cu T2D (Karlsson și colab., 2013) au fost probabil complicate de terapia farmaceutică (Forslund și colab., 2015), un studiu recent efectuat pe 277 de danezi a raportat modificări funcționale specifice în microbiomul fecal al persoanelor nediabetice rezistente la insulină (Pedersen și colab., 2016). Prin analize integrate de metagenomică și metabolomică, combinate cu studii mecaniciste la șoareci, *Prevotella copri* și *Bacteroides vulgatus* au fost identificați drept factori bacterieni ai rezistenței la insulină și a intoleranței la glucoză, confirmând astfel rolul etiologic al microbiotei intestinale în patogeneza T2D. Deși s-a demonstrat faptul că nutrienții constituenți ai dietei sunt un factor determinant puternic al ecologiei intestinale (Wu și colab., 2011), modificările dietetice fiind reflectate de modificările compoziționale în câteva zile (David și colab., 2014), rămâne de sesizat dacă caracteristicile microbiene asociate cu rezistența la

insulină și T2D la om sunt induse de tipare specific ale dietei, inclusiv de diete acidogene.

Apa potabilă alcalină a fost propusă de susținătorii medicinei alternative ca remediu pentru a contracara efectele unei diete acidogene. S-a raportat că modificările pH-ului apei afectează atât compoziția microbiotei intestinale, cât și metabolismul gazdei, după cum reiese din două studii recente efectuate la șoareci diabetic-predispuși neobezi (NOD) (Sofi și colab., 2014). Un studiu realizat de Wolf și colegii săi a arătat că apa neutră (pH $\approx$ 7) comparativ cu apa acidă (pH $\approx$ 3) a crescut incidența diabetului (Wolf și colab., 2014). Apa acidă a scăzut, de asemenea, abundența de firmicute și a crescut abundența de actinobacterii și proteobacterii. În contrast, un studiu realizat de Sofi și colab. a constatat că schimbarea apei potabile din acidă (pH $\approx$ 3) la neutră (pH $\approx$ 7) a scăzut incidența diabetului și a ratei de progresie a bolii, însoțită de o reducere a abundenței genului *Bacteroides* și unele specii de *Prevotella* (*P. oris*, *P. copri*, *P. loescheii* și *P. melaninogenica*), întrucât alte specii de *Prevotella* (*P. shahii* și *P. multiformis*) au fost crescute alături de specii de *Parabacteroides* (*P. distasonis* și *P. goldsteinii*) (Sofi și colab., 2014). Diferențele în microbiota intestinală de bază, împreună cu diferența în alte circumstanțe de mediu, au fost propuse ca explicație pentru rezultatele contradictorii privind incidența diabetului și rata de progresie (Zhao și colab., 2015). Important este faptul că ambele studii au arătat diferențe substanțiale în microbiota intestinală a șoarecilor care beau apă acidă și neutră, demonstrând că pH-ul apei potabile poate avea un impact profund asupra comunității microbiene intestinale. Șoarecii NOD sunt cel mai frecvent utilizat model de rozătoare al diabetului autoimun (King, 2012). De remarcat a fost un studiu recent ce a arătat că șoarecii NOD dezvoltă rezistență la insulină, rezistența la insulina hepatică fiind prezentă deja în faza pre-diabetică și sensibilitatea la insulina musculară fiind afectată încă din ziua a treia de la debutul diabetului (Jelenik și colab., 2014). Luate împreună, aceste observații sugerează că efectele modificărilor pH-ului apei potabile raportate de Wolf și colab. și Sofi și colab. pot fi parțial influențate de mecanisme care afectează rezistența la insulină pe lângă insulita autoimună mărită.

În studiul realizat de Hansen și colab. (2018) au fost investigate posibilele modificări compoziționale în comunitatea microbiană intestinală și reglarea glucozei la adulții tineri sănătoși după administrarea de apă potabilă alcalină vs. apa potabilă neutră. Voluntarii au fost recrutați prin publicitate prin resurse online și prin publicitate ulterioară la campusurile Universității din Copenhaga. Bărbați sănătoși, nefumători, cu vârste cuprinse între 18 și 35 de ani, cu un indice de masă corporală cuprins între 20,0 și 27,0 kg·m⁻² au fost eligibili pentru includere. Bărbații nu au fost eligibili dacă au avut anterior o

intervenție chirurgicală abdominală, nu au fost stabili în greutate timp de cel puțin două luni, au primit tratament antibiotic în decursul ultimelor 2 luni sau au avut un consum habitual de băuturi calorice sau îndulcite artificial mai mult de 1 L/săptămână sau un aport mediu de alcool peste 7 unități/săptămână. Participanții care au avut nevoie de tratament medical în timpul perioadei de studiu au fost excluși. Un total de 30 de voluntari au fost incluși într-un studiu încrucișat, neorb, randomizat, cu două perioade de intervenție de 2 săptămâni și o perioadă de intermisie interpusă de cel puțin 3 săptămâni. Participanții au fost examinați înainte și după fiecare perioadă de intervenție. Secvența de tratament a fost atribuită la întâmplare prin utilizarea unui algoritm computerizat. În timpul perioadelor de intervenție, participanții au fost instruiți să-și potolească setea consumând apă experimentală. Participanții au fost obligați să ingereze cel puțin doi litri distribuiți pe parcursul zilei și să înregistreze aportul zilnic. A fost interzisă administrarea regulată a apei de la robinet în timpul perioadelor de intervenție. Participanții au primit un recipient portabil, etanș pentru transportul și depozitarea apei în afara casei. În perioada de intermisie de 3 săptămâni dintre cele două perioade de intervenție, participanții au fost instruiți să revină la obiceiurile lor normale.

Fiecare participant a primit un dispozitiv comercial validat (PUREPRO USA CORP, IL SUA) capabil să producă apă cu pH specific prin schimb de ioni și electroliză, pentru a fi utilizat în timpul fiecărei perioade de intervenție. Dispozitivele au fost instalate la robinetul de apă potabilă în casele participanților. Pentru fiecare participant, același dispozitiv a fost utilizat în timpul ambelor perioade de intervenție. Pentru intervenția cu apă potabilă neutră, pH-ul mediu a fost de 7,19 (intervalul 7,01-7,38), iar pentru intervenția cu apă potabilă alcalină, pH-ul mediu a fost de 9,06 (intervalul 8,64-9,44), corespunzând unei diferențe medii de pH de 1,87 (intervalul 1,55- 2,33) între intervenții.

Simptomele gastro-intestinale au fost evaluate printr-un chestionar digital, iar analizele de sânge, urină și fecale, cât și colectarea datelor atropomorfe s-au realizat constant pe parcursul celor 2 perioade de intervenție.

În urma analizei rezultatelor testelor realizate, echipa lui Hansen nu a observat un efect al modificării pH-ului apei potabile asupra diversității globale. În mod similar, nu s-a observat niciun efect pentru bogăția microbiotei la compararea intervențiilor cu apă alcalină și neutră. Cu toate acestea, în analizele *post hoc*, comparând eșantioane pre și post-intervenție pentru fiecare intervenție, a fost observată o creștere de 15,8% a bogăției observate și o creștere a bogăției estimate după intervenția cu apă neutră care a rămas semnificativă după corecție pentru testarea multiplă. La fel, a existat o creștere

de 9,5% în diversitatea globală reprezentată de indicele Shannon, deși efectul nu a fost semnificativ statistic după corectarea multiplicității. Nu a fost observată nicio modificare a bogăției sau a diversității globale în timpul intervenției cu apă alcalină.

Principala coordonare a ordinii structurii comunității și a apartenenței la comunitate, astfel cum a fost evaluată prin diferențierea Bray-Curtis și distanțele UniFrac (neponderate și ponderate) au dezvăluit răspunsuri foarte individuale atât la intervențiile cu apă alcalină, cât și la cele neutre. Efectul apei alcaline în raport cu apa neutră asupra structurii comunității a fost analizat prin compararea probelor post-intervenție din cele două perioade. Folosind analiza PERMANOVA, nu a fost observată nicio diferență între cele două intervenții. În perioadele de intervenție individuale a fost sesizat un efect al apei neutre asupra calității de membru al comunității, însă care nu a rămas semnificativ statistic. Nu a fost observat niciun efect asupra structurii comunității sau a apartenenței la comunitate în timpul intervenției alcaline.

Compoziția de bază a microbiotei fundamentale a fost dominată de membrii celor două ordine majore *Bacteroidete* (49,7%) și *Firmicutes* (45,4%) cu *Prevotellaceae* (24,9%), *Lachnospiraceae* (20,7%), *Bacteroidaceae* (18,6%) și *Ruminococcaceae* (15,6%) ca familii predominante, deși cu variații substanțiale inter-individuale. Nu a fost sesizat niciun efect diferențial semnificativ al celor două intervenții la nivelul taxonilor colectivi, însă nominal, 10 taxoni au fost mai puțin abundenți și unul a fost mai abundent după intervenția alcalină decât după intervenția neutră. Rezultatele agregate la nivel de gen au fost similare, fără efecte semnificative ale apei alcaline față de cea neutră.

Privind modificarea abundenței relative a taxonilor individuali în fiecare perioadă de intervenție, a fost observat un efect al apei neutre pe 40 din 201 taxoni de bază, dintre care 6 au prezentat un efect semnificativ: trei atribuite genului *Bacteroides*, unul atribuit speciilor *Prevotella copri*, unul atribuit familiei *Ruminococcaceae* și unul atribuit ordinului *Clostridiales*. De asemenea, a fost exprimat un efect al intervenției apei alcaline asupra abundenței relative a 11 taxoni de bază, dar niciunul nu a rămas semnificativ statistic.

Toți participanții au fost toleranți la glucoză și au avut glucoză normală la repaus la examinarea inițială. Testul global ce a luat în considerare toate punctele de timp eșantionate nu a arătat o diferență semnificativă între intervenții, nici în concentrația de glucoză plasmatică ($p = 0,13$), nici în concentrația serică de insulină ($p = 0,53$) după cele două intervenții. În mod similar, atunci când au fost luate în considerare numai glucoza și insulina stimulate (adică 30 până la 120 de minute de la intervenție) nu a existat un efect semnificativ al apei alcaline în comparație cu cea neutră ($P = 0,07$ și $0,39$).

pentru glucoză și respectiv insulină). Luând în considerare punctele de timp individuale separat, analizele efectuate de Hansen și colab. au arătat faptul că glucoza plasmatică a fost cu 9,3% mai mare la 30 de minute după intervenția cu apă alcalină comparativ cu intervenția cu apă neutră. Este important de menționat că niciunul dintre efectele observate asupra glucozei plasmatice nu a rezistat corecției pentru multiplicitate la o rată de descoperire falsă predefinită de 5%. Nu a existat un efect detectabil al apei alcaline în comparație cu apa neutră asupra concentrației serice de insulină și nici nu a fost sesizat un efect asupra indicilor funcției celulelor beta sau a rezistenței la insulină. În mod similar, nu a existat un efect distinct al apei alcaline în comparație cu apa neutră asupra hsCRP ($p = 0,89$). Nu a existat un efect măsurabil al apei alcaline în comparație cu cea neutră asupra pH-ului urinei în repaus alimentar ($p = 0,69$).

Nu au fost observate nicio diferență în frecvența mișcărilor intestinale și nici în severitatea simptomelor gastro-intestinale la compararea intervențiilor cu apă alcalină și neutră.

În studiul realizat de echipa lui Hanen și colab. au fost incluși doar voluntari sănătoși în încercarea de a reduce potențialele efecte confuzive legate de sex, demografie și starea de sănătate. În consecință, nu poate fi exclus faptul că o modificare a pH-ului apei potabile ar putea afecta compoziția microbiotei intestinale în cazul disbiozei preexistente. Mai mult, este posibil ca un efect asupra metabolismului glucozei să fie mai pronunțat la persoanele rezistente la insulină sau la persoanele cu funcție redusă a celulelor beta.

Compoziția microbiotei intestinale la momentul inițial a fost comparabilă cu ceea ce a fost raportat anterior la indivizii sănătoși, atât în ceea ce privește abundența medie a taxonilor majori, cât și variația interindividuală (Segata și colab., 2012). După cum au subliniat Wolf și colab. și Sofi și colab., rezultatele contrastante observate la șoarecii NOD sunt posibil atribuibile variației inițiale a microbiotei intestinale. Limitări similare se aplică atunci când se studiază oamenii cu un stil de viață neîngrădit, în care variația compozițională interindividuală la variația temporală inițială și intraindividuală este probabil mult mai mare decât la șoarecii de laborator.

Un studiu realizat de Murakami și colegii săi a investigat efectul apei minerale bogate în bicarbonat față de apa de la robinet asupra reglării glucozei și a compoziției microbiotei intestinale la 19 voluntari sănătoși (Murakami și colab., 2015). Aceștia au raportat o scădere semnificativă a glico-albuminei, precum și o creștere a abundenței relative a familiilor *Bacteroidaceae*, *Christensenellaceae*, *Dehalobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Porphyromonadaceae* și *Rikenellaceae*, precum și o scădere a familiei *Bifidobacteriaceae* după consumul a 500 ml apă bogată în

bicarbonat timp de 1 săptămână. De observat, concentrația de bicarbonat a fost de 100 de ori mai mare în apa bogată în bicarbonat comparativ cu apa de la robinet, în timp ce pH-ul a fost mai mic (7,07 comparativ cu 7,58 în apa de la robinet). Acest lucru evidențiază aspecte importante privind efectele potențiale ale variației pH-ului apei potabile. pH-ul ca măsură a activității ionilor de hidrogen a unei soluții apoase nu spune nimic despre capacitatea de tamponare a soluției menționate. De exemplu, o soluție de bicarbonat de sodiu este de multe ori mai eficientă în tamponarea mediului acid din stomac decât o soluție de hidroxid de sodiu cu același pH. Având în vedere rezultatele care arată o creștere a familiilor *Streptococcaceae* și *Micrococcaceae* asociate cu utilizarea inhibitorilor pompei de protoni (Jackson și colab., 2015), este rezonabil să se presupună că efectul potențial al apei potabile asupra microbiotei intestinale este legat de capacitatea de tamponare a acesteia. Compoziția minerală a apei poate avea, de asemenea, un efect asupra compoziției microbiotei intestinale, indiferent de proprietățile acido-bazice. Cationii divalenți afectează stabilitatea membranei exterioare a bacteriilor Gram-negative (Clifton și colab., 2015) și sunt implicate în procesele de imobilitate, transport și diferențiere celulară (Dominguez, 2004).

După cum s-a demonstrat recent folosind seturi de date bazate pe populație (Falony și colab., 2016), studiile de intervenție care vizează identificarea unei schimbări de microbiomi specifice unei asociații cunoscute sunt susceptibile de a necesita dimensiuni considerabile ale eșantionului. Astfel, observațiile realizate de Hansen și colab. sunt de natură exploratorie și nu se poate exclude faptul că o dimensiune mai mare a eșantionului ar fi arătat o diferență semnificativă între cele două intervenții.

Limitările studiului prezentat includ anumite aspecte ale proiectării sale. Participanții au fost instruiți să își mențină tiparul de dietă obișnuit. Cu toate acestea, orice modificare neintenționată a dietei în timpul perioadei de studiu ar putea influența atât microbiota intestinală, cât și reglarea glucozei, ascunzând orice efect real al modificării pH-ului apei potabile.

În analiza *post hoc*, analizele modificărilor compoziției microbiotelor în cadrul fiecărei intervenții au observat o creștere semnificativă a abundenței relative a șase taxoni, precum și o creștere semnificativă a bogăției observate și estimate, în timpul intervenției cu apă neutră. Nu au fost observate efecte semnificative în timpul intervențiilor alcaline. O explicație posibilă pentru acest efect aparent ar putea fi faptul că participanții au băut mai mult în timpul perioadelor de intervenție decât au făcut-o de obicei, deoarece era necesar un aport zilnic minim de 2 litri. O altă posibilă explicație este că băuturile obișnuite au fost înlocuite cu apă în timpul perioadelor de intervenție. Printre participanții la studiu se numărau și băutori obișnuiți de cafea. Efectele cafelei

(decofeinizate, precum și cofeinizate) asupra fiziologiei gastro-intestinale includ secreția crescută de acid gastric, contracția vezicii biliare și motilitatea rectosigmoidă (Boekema și colab., 2009). În paralel cu aceste efecte stimulatoare, s-au demonstrat modificările compoziției microbiotei intestinale induse de cafea la șobolanii cu conținut ridicat de grăsimi (Coean și colab., 2014) și creșterea abundenței de *Bifidobacterium sp.* la oameni (Jaquet și colab., 2009). Modificarea consumului de cafea în timpul intervențiilor nu a fost înregistrată și orice efect al substituției băuturilor este doar speculativ. De asemenea, este posibil ca schimbarea compozițională observată să fie cauzată de un efect al mașinii, indiferent de pH-ul ales. Cu toate acestea, natura exactă a unui astfel de efect este necunoscută.

10. Asocierea dintre dieta alcalină, apa alcalină și cancer

Publicul larg este încurajat de presă ca, pentru prevenirea cancerului, să își determine valoarea acidității salivei sau urinei pentru a-și evalua aciditatea corpului și ulterior, să își modifice dieta în mod corespunzător. Dieta alcalină este promovată pe baza afirmațiilor că dietele moderne acidifică organismul, cauzând boli, inclusiv cancer, osteoporoză și boli cardiovasculare (Corrett, 2015). Dieta alcalină este, de asemenea, promovată în cazul diabetului zaharat și hipertensiunii arteriale. Promotorii acestei diete susțin că schimbarea alimentară cu selecții mai mult „alcaline” împiedică toate aceste condiții (Corrett, 2015) și are capacitatea de a trata cancerul odată ce a fost dezvoltat (Marra, 2014). Această dietă se bazează pe conceptul că substanțele minerale din alimente fac corpul acid, alcalin sau neutru (Dwyer și colab., 1985).

Dieta alcalină este concepută pentru a oferi mai mulți ioni alcalini, bazată fiind pe ipoteza cenușii acide care s-a dezvoltat acum peste 100 de ani (Sherman și Gettler, 1912). Aceasta sugerează că, pentru a obține o încărcătură mai alcalină, trebuie consumate mai multe fructe și legume cu un aport moderat de proteine. În timp ce comercializarea acestei diete implică faptul că modificările dietei vor crește pH-ul sistemic, un studiu randomizat bine condus al acestor modificări ale dietei a concluzionat faptul că schimbările implementate au modificat doar pH-ul sistemic cu 0,014 unități, în timp ce pH-ul urinei a crescut cu 1,02 unități. Acest studiu relevă faptul că modificările dietei pot modifica pH-ul urinei, dar nu modifică pH-ul sângelui (Buclin și colab., 2001). Mai mult, faptul că efectul fosforului asupra metabolismului calciului a fost opus celui care a fost prezis de ipoteză (Fenton și colab., 2009) ridică întrebări despre validitatea ipotezei în primul rând. Adicional, o revizuire asupra corpului de dovezi privind ipoteza cenușii acide / alcaline pentru sănătatea densității osoase a constatat că ipoteza nu este susținută și nu

există dovezi cum că modificarea încărcăturii de acid din dietă îmbunătățește sănătatea oaselor (Fenton și colab., 2011).

Dieta alcalină promovează nu numai un regim alimentar specific, ci și vânzarea de suplimente și aparate alcalinizatoare de apă aferente, prin aproape toate instrumentele media, inclusiv site-uri web, cărți și videoclipuri (Ohsawa, 2012). Din experiențe anterioare, pacienții de cancer sunt abordați de vânzători care promovează alcalinizatoarele de apă ca modalitate de tratare a cancerului. Studiile sugerează că un număr substanțial și în creștere de pacienți utilizează internetul pentru a obține informații despre sănătate (Helft și colab., 2003), fapt care poate să nu fie inofensiv. Oncologii raportează că utilizarea internetului de către pacienții cu cancer contribuie la confuzie și anxietate în rândul acestora (Helft și colab., 2003).

Există dovezi asupra faptului că unele celule canceroase și tumori cresc bine într-un mediu acid în laborator (McCarty și Whitaker, 2010). În timp ce dieta alcalină este promovată pentru a corecta starea acidă pe care o creează dieta modernă, Institutul American de Cercetare a Cancerului și Societatea Canadiană a Cancerului au declarat că organismul reglează strâns pH-ul sistemic și că alegerile alimentare vor afecta doar pH-ul urinei și nu aciditatea corpului (American Institute of Cancer Research, 2012). Studiile arată că, în timp ce pH-ul urinei se modifică drept răspuns la modificările dietei, pH-ul din sânge, nu (Maurer și colab., 2003). Deoarece potențialul de formare al acidului/bazei alimentelor modifică pH-ul urinar (Maurer și colab., 2003), cancerul tractului urinar poate fi un punct important în investigarea afirmațiilor din dieta alcalină pentru prevenirea și tratarea cancerului.

În anul 2015, Fenton și Huang au realizat un studiu ce a avut drept obiectiv efectuarea unei căutări ample a literaturii publicate și nepublicate pentru a determina dacă există dovezi ale unei relații cauzale între acidul/alcalinul dietetic și etiologia cancerului și/sau tratamentul acestei boli. Au fost căutate studii umane observaționale ale aporturilor acido-bazice, consumul sărurilor suplimentare pentru modificarea pH-ului sistemic (cum ar fi bicarbonatul de potasiu sau citratul de potasiu) și consumul de apă alcalină, cu rezultate asupra cancerului (atât etiologice, cât și terapeutice). Nu au fost impuse restricții de limbă sau de dată a publicării. Au fost luați în considerare participanții umani de toate vârstele și mediile. Studiile fără cercetări originale și studii non-umane au fost excluse din această revizuire. Ambii recenzori au examinat titlurile articolelor pentru relevanța subiectului și potențiala potrivire la criteriile de includere în mod independent, cu planul de a utiliza discuția și rezoluția prin atingerea consensului cu privire la orice diferențe în evaluări. A fost folosită Scala Newcastle-Ottawa pentru a evalua studiul inclus pentru riscul de prejudecată (Wells și colab., 2000).

Un total de 8278 de citate au fost identificate, iar 252 de rezumate au fost revizuite pentru potențiala potrivire cu cerințele acestui articol. Doar un studiu a îndeplinit criteriile impuse (Wright și colab., 2005) și a fost inclus în această revizuire sistematică. Căutarea din literatură a localizat, de asemenea, o revizuire sistematică care nu a găsit dovezi pentru dieta alcalină (Huebner și colab., 2014) și două recenzii narative care discută despre dieta alcalină și cancer (Robey, 2012). Revizuirea sistematică, publicată în 2014, a raportat rezultate pentru articole pe tema dietei alcaline și cancer într-o căutare pe Google, însă nu a raportat descoperiri ale acestor articole sau citările acestora (Huebner și colab., 2014). Cele două recenzii narative nu au inclus studii efectuate pe om despre o asocieră între dieta acidă / alcalină și cancer. Robey (2012) a concluzionat faptul că există numeroase căi sistemice afectate de acidoza indusă de dietă care poate favoriza cancerul, dar un rol cauzal este slab definit. Recenzia lui Lee și Shen a sugerat o analogie *post hoc* între conceptele din medicina tradițională chineză despre yin și yang și dieta acidă / alcalină, dar nu a menționat niciun studiu privind dieta acidă / alcalină și cancer.

Studiul realizat de Wright și colab. (2005), a fost unul prospectiv de cohortă, situat în interiorul studiului α -tocoferolului și al β -carotenului utilizate în prevenția cancerului. S-a examinat cantitatea de acid din dietă și rata de apariție a cancerului la vezica urinară. Expunerea utilizată în acest studiu a fost o estimare a excreției acide nete renale, pe baza aporturilor alimentare și a antropometriei. Nu s-au găsit studii care să fi examinat orice alte rezultate ale cancerului sau neoplaziei corelate cu dieta, alcalinitate, apă alcalină, utilizarea unei diete alcaline sau schimbarea încărcăturii de acid din dietă pentru tratamentul cancerului. Wright și colab. au examinat relația dintre excreția acidă netă renală estimată din dietă utilizând un chestionar privind frecvența alimentelor (și înălțimea măsurată și greutatea subiecților pentru estimarea excreției de acid organic urinar) și riscul de cancer al vezicii urinare într-o cohortă mare de 27 096 de bărbați fumători. Estimarea riscului relativ pentru cancerul de vezică urinară a fost de 1,15 pentru indivizii din cel mai acid versus cel mai puțin acid grup, așa cum a fost evaluată într-un model de riscuri proporționale multivariate, o relație ce nu este statistic relevantă. Acești cercetători au testat, de asemenea, dacă urina acidă a fost asociată cu un risc crescut de cancer al vezicii urinare la un subgrup de fumători pe termen lung. Printre bărbații care au fumat mai mult de 45 de ani, a existat un risc relativ ajustat, nesemnificativ, de ocurență a cancerului de vezică urinară de 1,72 cu niveluri ale excreției acide nete mai ridicate.

Revizuirea realizată de Fenton și Huang (2015), bazată pe un singur studiu observațional relevant, nu a găsit suport pentru ipoteza cenușii acide

care sugerează că acidul din dietă cauzează sau contribuie la dezvoltarea cancerului. Căutarea realizată în literatura de specialitate nu a identificat studii despre această ipoteză pentru alte forme de cancer sau tratament pentru cancer. În plus, căutarea nu a reușit să localizeze niciun studiu care să evalueze dacă apa alcalină are un rol în prevenirea sau tratamentul cancerului. Astfel, există o lipsă de sprijin pentru orice sfaturi adresate publicului cu privire la ipoteza cenușii acide, dieta alcalină și / sau apa alcalină și relațiile lor cu cancerul.

Unele articole sugerează că modificările homeostaziei acido-bazice în micromediul adiacent tumorii sunt frecvente în patologia cancerului (McCarty și Whitaker, 2010) și că lichidul interstițial tumoral are o capacitate de tamponare redusă comparativ cu țesuturile normale și, împreună cu ratele ridicate de producție a produselor finale metabolice, tumorile pot provoca un mediu extracelular acid (Gillies și colab., 2004). În plus, terapia cancerului poate fi influențată de pH. Unele studii *in vitro* și pe animale au sugerat că alcaloza metabolică poate fi utilă în îmbunătățirea unor regimuri de tratament pentru cancer (Raghunand și Gillies, 2001).

Cu toate acestea, aceste examinări *in vitro* și pe cobai asupra comportamentului celulelor canceroase se află în faza de generare a ipotezelor și nu ar trebui să fie extrapolate la sănătatea umană. Aceste studii de cultură celulară nu oferă dovezi cu privire la etiologia sau tratamentul cancerului. Studiile au demonstrat că suplimentele alcaline (Maurer și colab., 2003) sau dietele care promovează alcalinizarea (Buclin și colab., 2001) pot modifica pH-ul urinei. Cu toate acestea, ele nu modifică semnificativ pH-ul sistemic global (Maurer și colab., 2003). Trei studii privind intervențiile de încărcare acidă au măsurat atât modificările pH-ului din urină, cât și ale sângelui ca urmare a diferitelor intervenții, inclusiv modificări ale consumului de alimente (Buclin și colab., 2001), ingerarea de sare de bicarbonat (Maurer și colab., 2003) sau de fosfat (Krapf și colab., 1995). În fiecare caz, pH-ul urinei a crescut semnificativ, de la 0,2 la 1,2 unități, în timp ce pH-ul din sânge s-a modificat minimal, cu doar 0,01 (Maurer și colab., 2003) la 0,02 (Krapf și colab., 1995) unități. Această comparație arată că rinichii sunt eficienți în privința eliminării acidului pentru a menține echilibrul sistemic al pH-ului și că pH-ul urinei nu oferă o măsurare a pH-ului sistemic.

Niciunul dintre aceste studii nu a susținut ipotezele care sugerează că apa alcalină susține o sănătate bună. Au fost găsite câteva rezultate vizând efectele apei alcaline, inclusiv la om, reprezentate de secreția gastrică inhibată (Drobnik, 2000), golire redusă a vezicii biliare (Gasbarrini și colab., 1991) și reacții toxice (Lendowshi și colab., 2015), iar în cazul puilor de șobolan, de necroză cardiacă (Watanabe și colab., 1997) și restricție de creștere (Merne și

colab., 2001). Prin urmare, promovarea apei alcaline ca promotor al a sănătății nu este încă susținută de dovezi.

Poate exista o problemă de siguranță care implică consumul unei „diete alcaline” urmată de creșterea pH-ului urinei la pacienții cu cancer al vezicii urinare. De exemplu, influența ciprofloxacinii pe liniile celulare ale vezicii umane sugerează că potențialul antiproliferativ și efectul antitumoral al acestui medicament pot fi superioare la pH scăzut în urină (Guetowska și colab., 2010). În general, considerațiile de siguranță pentru creșterea pH-ului urinar la pacienții cu cancer al vezicii urinare care urmează anumite tratamente de terapie împotriva cancerului trebuie evaluate înainte ca pacienții să efectueze modificări ale pH-ului urinei.

Direcția studiilor viitoare se poate concentra pe analize sistematice pentru examinarea relațiilor dintre dieta alcalină și alte condiții de sănătate. Mai multe studii prospective observaționale au sugerat o relație între încălcătura acidă și riscul de diabet de tip 2 (Akter și colab., 2016) precum și hipertensiune (Akter și colab., 2015). Cu toate acestea, estimările efectului sunt de magnitudine mică, sub pragul riscului relativ de 2, minimul considerat a indica asocieri importante (Guyatt și colab., 2011). Alte studii prospective au sugerat o lipsă de asociere între încălcătura acidă din dietă și riscurile diabetului de tip 2 (Engberink și colab., 2012) precum și hipertensiune (Xu și colab., 2014). Mai mult, în studiile observaționale, este posibilă o confuzie reziduală (Guyatt și colab., 2011), datorată variabilelor stilului de viață care sunt corelate, însă neluate în considerare la momentul experimentului. Prin urmare, nu se recomandă sugerarea ca informațiile din astfel de studii să reprezinte relații cauzale independente (Ioannidis și colab., 2009).

Este posibil ca unele dintre aceste alimente (fructele proaspete, legumele, rădăcinile și tuberculii și leguminoasele cu un aport moderat de proteine) să aibă efecte de protecție împotriva cancerului, nu prin calitățile lor de promovare a acidității / alcalinității, ci mai degrabă datorită compușilor nutritivi și non-nutritivi. O revizuire sistematică și meta-analiză a studiilor prospective arată că un aport ridicat de fibre dietare este asociat cu un risc redus de cancer colorectal (Aune și colab., 2012). O revizuire și meta-analiză a cercetărilor epidemiologice privind activitatea fizică, dieta și adipozitatea au constatat că un model dietetic prudent cu aporturi ridicate de fructe, legume, cereale integrale, leguminoase și pește pare că este protectoare împotriva cancerului de sân (Patterson și colab., 2010). Cu toate acestea, dieta alcalină promovează excluderea multor alimente, dintre care mai multe contribuie cu numeroase substanțe nutritive și nutrienți benefici.

11. Efectul apei alcaline cu pH ridicat asupra vâscozității sângelui la adulții sănătoși

Apa este un nutrient esențial pentru viață, iar hidratarea joacă un rol critic în performanța fizică a omului, precum și în prevenirea bolilor cronice. Deshidratarea este un factor contributor, bine acceptat, la afectarea performanței fizice umane, rezultând în orientări stabilite pentru înlocuirea lichidelor în multe profesii care implică activitate fizică semnificativă, inclusiv sportivi (Sawka și colab., 2007). Deficiențele mediate de deshidratare pot produce efecte nefavorabile, cum ar fi suprasolicitare cardiovasculară, solicitare calorică, funcția neurologică și metabolică modificate (Mountain și colab., 1992).

Reducerea masei corporale cu 2% sau mai mult din cauza transpirației în timpul exercițiilor a fost bine stabilită pentru a fi corelată cu performanțe aerobice și fiziologice afectate. În timp ce această afectare implică factori termoreglatori metabolici, neurologici și cardiovasculari importanți, principalul factor limitativ al performanței exercițiului este deriva cardiovasculară, reflectând o rezervă în scădere a volumului sangvin cerebral și presiunea arterială medie în timpul exercițiilor intense sau prelungite, împreună cu o creștere a ritmului cardiac (Cheuvrot și colab., 2010). Creșterile acestuia din urmă induse de efort, cu o scădere a volumului miocardic, se pot corela strâns cu gradul de deshidratare (Mountain și colab., 1992). S-a demonstrat că deshidratarea crește rezistența vasculară sistemică cu $17 \pm 6\%$ comparativ cu euhidratarea în timpul efortului prelungit ($p < 0,05$) (Gonzalez-Alonso și colab., 1995).

Numeroase studii au evaluat efectul rehidratant al lichidelor în jurul sesiunilor de exerciții, care au inclus suplimentarea cu apă, apă de cocos, sucuri, ceaiuri, băuturi răcoritoare, precum și băuturi cu carbohidrați, electroliți și glicerol (Kalman și colab., 2012). În majoritatea acestor studii, băuturile au fost administrate pe cale orală după o deshidratare provocată și abilitățile de rehidratare ale lichidelor de înlocuire specifice au fost evaluate folosind biomarkeri, evaluări ale performanței fizice și chestionare subiective. Un studiu care a implicat 6 bărbați sănătoși a sugerat faptul că concentrațiile mai mari, comparativ cu cele mai mici ale unei soluții de carbohidrați-electroliți au fost mai eficiente în restabilirea hidratării după exerciții (Evans și colab., 2009). Un studiu efectuat pe 10 jucători de fotbal a raportat că modificările de masă corporală și de volum plasmatic induse de efort au fost mai mici odată cu ingestia unei băuturi glucidice-glicerolice decât a unei băuturi carbohidrate, evidențiind o hidratare îmbunătățită prin adăugarea de glicerol (Siegler și colab., 2009). Un alt studiu care a monitorizat biomarkerii de hidratare a arătat

că apa de cocos nu a hidratat semnificativ mai bine decât apa normală (Kalman și colab., 2012).

S-a presupus că apa alcalină este superioară apei purificate standard în restabilirea rehidratării și a vâscozității sângelui în timpul unei perioade de recuperare de 2 ore după deshidratarea indusă de efort. Cu toate acestea, studii structurate specific ale unuia sau mai multor biomarkeri în timpul rehidratării după exerciții, nu au stabilit un biomarker standard pentru perioada de recuperare. Weidman și colab. au proiectat în anul 2016 un studiu randomizat, dublu-orb, pentru a caracteriza și a compara magnitudinea și rata de rehidratare a apei electrolizate cu pH ridicat față de apa purificată standard prin evaluarea nivelurilor serice ale unui biomarker specific al vâscozității sângelui integral ca obiectiv principal. În plus față de măsurarea vâscozității sângelui, au fost evaluate următoarele obiective secundare: vâscozitatea sângelui la viteză mică de modificare anatomică, osmolaritatea plasmatică, bioimpedanța și modificările greutateii corporale.

Studiul a fost realizat pe 100 de voluntari adulți (50 de bărbați, 50 de femei), între 25 și 49 de ani. Participanții eligibili au fost adulți sănătoși, care nu fumează, având un indice de masă corporală mai mic sau egal cu 29 și cărora nu le-a fost administrat orice tip de medicament timp de cel puțin o săptămână înainte de participarea la studiu.

Cele două băuturi studiate au fost reprezentate de apă îmbuteliată standard, drept control, având un pH normal cu minerale adăugate pentru gust și apă alcalină electrolizată (ERAW), cu pH ridicat și adaos de minerale pentru gust, drept băutura de tratament experimental.

Subiecților li s-a permis să consume alimente și apă după bunul plac înainte de studiu. În urma unei evaluări inițiale, participanții au fost rugați să se abțină de la consumul de alimente sau lichide. Evaluările inițiale pentru masa corporală, impedanța bioelectrică și semnele vitale (ritmul cardiac, tensiunea arterială sistolică și cea diastolică, rata respirației, temperatura corpului) au fost colectate la începerea studiului, înainte de exercițiul fizic. Probele de sânge au fost colectate prin puncție venoasă pentru evaluarea vâscozității sângelui integral și a osmolalității plasmatice. În urma măsurilor inițiale, subiecții au efectuat sesiuni de exerciții aerobice moderate într-un mediu cald (30 °C, 70% umiditate relativă) până când au atins o stare deshidratată. Durata exercițiului a variat între subiecți. Cu toate acestea, ținta pragului de deshidratare a fost standardizată la $2,0 \pm 0,2\%$, pierderea în greutate corporală datorată efectelor unei perioade de exercițiu în producerea unei deshidratări ușoare. După încheierea perioadei de exercițiu și atingerea unei stări deshidratate, participanții la studiu s-au mutat într-un mediu termo-neutru (21°C, 60% umiditate relativă), unde s-au odihnit 20 de minute. După această perioadă de

odihnă, au fost evaluate semnele vitale, greutatea și bioimpedanța. În plus, s-au recoltat probe de sânge pentru evaluarea vâscozității sângelui și a osmolarității plasmatice.

Un studiu anterior, care a evaluat efectul soluției orale de carbohidrați asupra ratei de absorbție, a raportat o reducere de aproximativ 3% a volumului plasmatic pe parcursul unui interval de 105 minute după consumul băuturii (Shi și colab., 1995). Studiul realizat de echipa lui Weidman a încorporat o perioadă de urmărire de 120 de minute – considerată a avea o durată suficient de lungă pentru a arăta orice efect al rehidratării în timpul recuperării – ce a fost împărțită într-o perioadă de rehidratare de 30 de minute și o perioadă de recuperare de 90 de minute. Participanții au fost rehidratați oral cu apă standard sau apă alcalină (T000 până la T030 min). Masa apei consumate în perioada de rehidratare a fost calculată în funcție de schimbarea masei corporale a participantului în timpul exercițiului. Cantitatea recomandată de lichide a fost determinată utilizând o formulă de 20 ml de lichid la 1 kg de greutate corporală, adică 2% din greutatea corporală inițială înainte de exercițiu. Subiecții au fost obligați să consume întreaga cantitate de apă desemnată după exerciții *ad libitum* în 30 de minute. Probele de sânge au fost colectate pentru vâscozitatea sângelui integral și osmolaritatea plasmei la T015 min și T030 min în această perioadă de rehidratare.

Au fost colectate date suplimentare în timpul perioadei de recuperare de 90 de minute (T030 până la T120 min) pentru a evalua pe deplin eventualele variații potențiale ale parametrilor măsurați. Vâscozitatea sângelui și osmolaritatea plasmatică au fost evaluate de șapte ori: la momentul inițial și la șase intervale ulterioare (T000, T015, T030, T060, T090 și T120 min). Analiza bioimpedanței și măsurătorile modificării masei corporale au fost efectuate de cinci ori: la momentul inițial și la patru intervale ulterioare (T000, T045, T075 și T120 min). Semnele vitale au fost evaluate în total de trei ori: la momentul inițial, la T000 și T120 min.

Datele au fost analizate folosind atât statistici descriptive, cât și inferențiale. Au fost planificate în prealabil patru analize separate: compararea modificării procentuale a biomarkerilor, compararea pantei liniilor de regresie, diferențele absolute și analizele modelului mixt. O comparație a modificării procentuale a fiecărei măsuri rezultate a fost efectuată în timpul perioadei de rehidratare și recuperare. O astfel de analiză a fost destinată să compenseze diferențele individuale la valorile inițiale și la valorile T000 min. Valorile medii pentru fiecare grup și estimările erorilor standard pentru fiecare interval de încredere trebuiau calculate și concluziile făcute pe baza acestor diferențe.

Modificarea procentuală în timpul perioadei de rehidratare de la T000 la T120 min a fost calculată pentru fiecare măsurătoare, reflectând magnitudinea

generală a hidratării în timpul perioadei de rehidratare și recuperare, după deshidratarea standardizată indusă de efort, compensând în același timp diferențele inter-individuale la momentul inițial și T000 min. Subiecții au acționat ca propriile lor controale, iar variabilitatea inter-individuală a punctelor finale a fost moderată prin împărțirea diferenței între starea deshidratată a subiectului (T000 min) și starea finală rehidratată (T120 min) după valoarea stării proprii de deshidratare.

După rehidratare și recuperare, modificarea procentuală medie pentru vâscozitatea sistolică a sângelui, măsurată la o rată 300 s^{-1} , la subiecții cărora li s-a administrat apă standard a fost 3,36%, în timp ce pentru apa alcalină, modificarea procentuală medie a fost 6,30% ($p=0,03$). În mod nominal, apa alcalină a redus semnificativ și a restabilit vâscozitatea sângelui în timpul unei perioade de rehidratare de 120 de minute cu 87,50% mai mult decât apa standard. După rehidratare și recuperare, modificarea procentuală medie pentru vâscozitatea diastolică a sângelui (măsurată la o rată mică, de 5 s^{-1}) la subiecții cărora li s-a administrat apa de control a fost de 5,43%, în timp ce modificarea procentuală medie pentru apa alcalină a fost de 9,35%. Mai mult, nicio altă variabilă rezultată, care servește drept marker de hidratare, nu a demonstrat o diferență semnificativă între cele două grupe de tratament atunci când se compară schimbarea procentuală a măsurii rezultatului în timpul perioadei de rehidratare (T000 la T120 min).

Nu a fost detectată nicio diferență semnificativă în parametrul pantei între cele două axe de tratament pentru fiecare punct final. S-a observat o tendință pentru media nivelurilor de vâscozitate sistolică și diastolică a sângelui, care au scăzut mai repede (panta negativă mai mare) pentru apa alcalină în comparație cu cea standard. S-a observat că impedanța bioelectrică a crescut mai rapid pentru apa alcalină în comparație cu apa de control.

Folosind analize de model mixt, s-a observat că efectul tratamentului cu apă alcalină, comparativ cu cel al apei standard, a prezentat un efect îndeosebi asupra vâscozității diastolice ($p=0,02$). Efectul tratamentului cu apă alcalină nu a fost observat ca fiind semnificativ pentru celelalte măsurători ale vâscozității diastolice a sângelui, osmolarității plasmatice sau a indicilor de impedanță bioelectrică. Analiza modelului mixt a confirmat diferența semnificativă a efectului apei alcaline asupra vâscozității sângelui, arătând că aceasta a avut un efect semnificativ statistic asupra vâscozității sistolice a sângelui în comparație cu controlul. Cu toate acestea, interacțiunea dintre tratament-grup de studiu-timp asupra vâscozității sistolice a sângelui nu a fost în sine semnificativă.

Interesul pentru studiul biomarkerilor pentru hidratare s-a intensificat în ultimii ani. Totuși utilitatea relativă a markerilor depinde de mediu și de natura

stimulilor aplicați într-un studiu dat. Chiar și în studiile privind răspunsurile la deshidratarea acută indusă de efort, un biomarker standard pentru starea de hidratare s-a dovedit evaziv (Cheuvront și colab., 2010). Vâscozitatea a fost utilizată ca obiectiv principal final în studiul realizat de Weidman și colab. pentru a reflecta hidratarea intravasculară și a fost în mod clar afectată de deshidratarea indusă de efort. Mai multe studii anterioare au raportat creșteri ale vâscozității sângelui după exerciții (Smith și colab., 2015). Într-un studiu pe 20 de adulți sănătoși, s-a raportat că vâscozitatea sângelui crește după 15 minute de exercițiu submaximal (Nageswari și colab., 2002). Într-un studiu clinic anterior efectuat pe 47 de femei cu anduranță ridicată și femei neantrenate, nivelele medii ale vâscozității după 1 oră de exercițiu maxim au fost raportate ca fiind cu 12,6% mai mare, o creștere de magnitudine mai mare decât ar putea fi atribuită hematocritului, care a crescut cu o medie de 8,9% (Martin și colab., 1985).

Vâscozitatea sângelui nu este statică, ci se schimbă dramatic în funcție de forța de frecare sângelui. Forța se calculează prin împărțirea vitezei de curgere la diametrul lumenului. Când sângele se mișcă rapid la vârful sistolei, acesta este la o valoare mare și o consistență relativ mai subțire, deoarece eritrocitele sunt dispersate. La rate de frecare ridicate, vâscozitatea sistolică este influențată de nivelurile de hematocrit și de deformabilitatea eritrocitelor, în timp ce la rate de frecare mici, vâscozitatea diastolică este influențată de agregarea eritocitară (Cocklet și colab., 2007). Din acest motiv, vâscozitatea sistolică a sângelui poate fi capabilă să ofere un marker mai direct al stării de hidratare decât vâscozitatea diastolică a sângelui.

Diferența esențială între apa alcalin electrolizată, cu pH ridicat și apa potabilă standard, purificată prin osmoză inversă, utilizată drept control reprezintă gradul de alcalinitate. Într-un studiu pe 1136 de femei japoneze, Murakami și colab. au constatat că încărcătura dietetică acidă a fost asociată în mod independent cu o creștere semnificativă a presiunii sangvine sistolice și diastolice, a lipoproteinelor cu densitate mică (LDL) și a nivelurilor totale de colesterol, a indicelui de masă corporală și a circumferinței taliei (Murakami și colab., 2008). Acești cercetători au sugerat că factorii de risc cardiaci metabolici nefavorabili pot fi induși de acidoză metabolică ușoară care a crescut producția de cortizol. Heil a raportat o creștere semnificativă a pH-ului sanguin secundar consumului de apă alcalină bogată în minerale (Heil și colab., 2010). Separat, Heil și colab. au demonstrat o hidratare generală mai rapidă și mai bună cu apă alcalină decât cu apă standard îmbuteliată, la zece cicliști bărbați. Markerii de hidratare raportați aici au fost greutatea specifică a urinei, debitul de urină, concentrația proteinelor serice și retenția de apă (Heil și colab., 2009). În ambele studii, efectele au durat cel puțin o săptămână până

au aparut după consumul obișnuit de apă alcalină. În timp ce Heil și colab. nu au efectuat studii mecaniciste, aceștia au emis ipoteza că alcalinitatea sângelui a fost schimbată ca urmare a absorbției directe a mineralelor alcaline în sânge și că retenția de apă intravasculară a fost îmbunătățită prin absorbția de minerale suplimentare în sânge (Heil și colab., 2010). Într-un studiu mai recent realizat de același grup, s-a sugerat că mărirea pH-ului extracelular poate influența fluxul sanguin indirect prin modificarea concentrațiilor interstițiale de potasiu (Heil și colab., 2012).

Separat, un studiu care utilizează un protocol de deshidratare indus de efort pentru a compara efectul a două băuturi asupra markerilor pentru stresul oxidativ a arătat că recuperarea rehidratării după ingestia fie a unei băuturi carbohidrat-electrolitice, fie a apei a redus nivelurile de malondialdehidă, un marker comun pentru stresul oxidativ, în raport cu concentrațiile plasmatice de malondialdehidă în stare deshidratată (Paik și colab., 2009). Perturbările fluxului sanguin promovează o stare oxidativă în care se acumulează specii reactive de oxigen. Celulele roșii din sânge, în special, sunt vulnerabile la mediul oxidativ din corpul uman și, ca o consecință a conținutului de fier, sunt capabile să producă proprii radicali liberi (Baskurt și colab., 2003). Acest proces de auto-oxidare are loc în momentul în care hemoglobina oxidată e degradată și elaborează un superoxid. În același timp, ionul de Fier (Fe^{2+}) din structura hemoglobinei este oxidat la Fe^{3+} hemoglobină, producând methemoglobină care este incapabilă să transporte oxigen (Halliwell și coleg., 1999). Peroxizii din organism degradează proteinele hemoglobinei și determină eritrocitele să elibereze hem și fier. Forțele necesare pentru ca celulele roșii să perfuzeze capilarele pot determina membranele celulare să elibereze ioni, provocând leziuni suplimentare membranelor lipidice (Ney și colab., 1990). Atunci când speciile reactive de oxigen inițiază peroxidarea membranelor lipidice, proteinele membranei celulare devin adesea reticulate, iar celulele roșii devin mai rigide, cu o deformabilitate mai mică (Halliwell și colab., 1999). Producția de methemoglobină, modificarea și degradarea proteinelor, reticularea proteinelor membranare, peroxidarea lipidelor, reticularea hemoglobinei și afectarea proprietăților de suprafață sunt toate mecanisme prin care stresul oxidativ modifică funcțional celulele roșii din sânge (Baskurt și colab., 2003). Aceste mecanisme modifică proprietățile celulare, inclusiv fluiditatea membranei redusă și agregarea crescută, ceea ce duce la creșterea vâscozității sângelui și a fluxului sangvin (Nwose și colab., 2007).

Un studiu separat, realizat pe 154 de subiecți cu diferite stadii ale diabetului zaharat și martori sănătoși a arătat că mai mult de 76% din stresul oxidativ la subiecții aparent sănătoși a fost asociat cu creșterea vâscozității totale a sângelui, cu o prevalență de 95% în grupul cu prediabetic și cu 92% în

grupul cu diabet zaharat. (Richards și colab., 2010). Acest studiu clinic a măsurat markerii stresului oxidativ al eritrocitelor, incluzând glutationul eritrocitar, methemoglobina și malondialdehida. Asocierile dintre stresul oxidativ al celulelor roșii din sânge și vâscozitatea sângelui modificată la subiecții sănătoși, precum și cei cu diabet zaharat și pacienții prediabetici, sugerează că vâscozitatea sângelui poate fi un marker pentru stresul oxidativ subiacent.

Este speculat faptul că diferențele dintre nivelurile de vâscozitate sistolică cauzate de apa alcalină, comparativ cu controlul, după deshidratare, poate fi mediat de influența speciilor reactive de oxigen asupra membranelor eritrocitare și deformabilitatea acestora. Sunt necesare studii suplimentare pentru a determina dacă apa alcalină cu pH ridicat este direct asociată cu reducerea stresului oxidativ. În ceea ce privește osmolaritatea plasmatică drept marker de hidratare, Armstrong a remarcat faptul că un singur standard universal, inclusiv osmolalitatea plasmatică, nu este posibil pentru toate cerințele de evaluare a hidratării (Armstrong și colab., 2007). El a afirmat că schimbarea masei corporale este cea mai precisă evaluare a hidratării în timp real, iar analiza biomarkerilor, care nu includea vâscozitatea sângelui, a sugerat că precizia majorității markerilor de hidratare nu este susținută în mod constant. Modificările masei corporale reflectă pierderile de apă din corp și câștigurile secundare transpirației și, respectiv, aportului de apă. În consecință, modificările de masă sunt foarte frecvent măsurate în studii și servesc drept punct de referință pentru alți markeri de hidratare. Deși osmolaritatea plasmatică este considerată printre cei mai buni indici disponibili, niciuna dintre analizele efectuate în experimentul lui Weidman și colab. nu a arătat diferențe semnificative între apa alcalină și cea standard pentru acest marker. Osmolaritatea plasmatică nu încorporează influența conținutului celular din sânge și este dificil de evaluat atunci când apa corporală totală, aportul de lichide și pierderile de lichid sunt modificate.

Analiza impedanței bioelectrice a fost utilizată pe scară largă pentru a evalua starea de hidratare. Acest instrument permite determinarea volumelor de apă în diferite compartimente fluidice ale corpului. Este posibil ca deshidratarea acută și rehidratarea consecventă în cadrul studiului descris mai sus (2% masă corporală) să nu fi reușit să prezică cu exactitate modificările din apa corporală care altfel ar fi putut fi determinate prin evaluarea modificărilor masei corporale. Mai mult, la sportivii cu grăsime corporală scăzută, modificările mici ale apei din corp pot fi raportate greșit ca modificări ale grăsimii corporale prin testarea bioimpedanței (Saunders și colab., 1998). Modificările volumului extracelular și ale osmolarității pot afecta, de asemenea, precizia evaluărilor impedanței bioelectrice (Berneis și colab., 2000).

12. Mecanismul de acțiune al ARW

Amenințările semnificative pentru sănătate implică acumularea de ROS, însoțită de metabolismul lipidic dereglat și inflamație, care sunt factorii de risc primari pentru bolile metabolice din ce în ce mai răspândite legate de stilul de viață (Remig și colab, 2010). Din această perspectivă, este important să se exploreze relația dintre eliminarea ROS, controlul inflamator și metabolismul lipidelor. Cercetările privind apa ionizată alcalină au crescut de la prima sa abordare în Japonia în anii 1990 (Henry & Chambron, 2013). În prezent, ARW a fost aplicat în mai multe domenii, inclusiv în industria alimentară, agricultură și medicină. A primit o atenție extraordinară datorită tratamentului său medical eficient și nou pentru diferite boli imunitare și de stres oxidativ în China, Japonia și Coreea (Shirahata și colab, 2012; Huang și colab, 2006). ARW prezintă proprietăți speciale, cum ar fi un pH alcalin, o valoare ORP negativă a moleculelor de apă cu grupe mici și un conținut ridicat de hidrogen dizolvat. În general, ARW se formează prin electroliză, prin care apa (H_2O) se descompune în oxigen (O_2) și hidrogen (H_2) datorită unui curent electric. Generația ARW a progresat și a avansat. Cel mai recent, poate fi acum generată folosind energie regenerabilă (Brauns & Turek, 2020). ARW poate fi, de asemenea, generată cu diverși aditivi, cum ar fi minerale alcaline și nanoparticule (Huang și colab, 2008; Yan și colab, 2011), pentru a crește efectele sale antioxidante și terapeutice.

O serie de studii au arătat că ARW are proprietăți antioxidante și, astfel, ajută la contracararea radicalilor liberi din organism. Radicalii liberi pot provoca îmbătrânirea prematură și alte boli și afecțiuni. Se crede că proprietățile chimice ale ARW, în special pH-ul său, contribuie la efectele sale benefice. ARW prezintă un pH mai mare decât apa de la robinet, care joacă un rol important în eficacitatea sa cunoscută. Un studiu anterior a arătat că ARW ar putea induce eficient apărarea antioxidantă dependentă de H_2O_2 și $HOCl$ și poate reduce stresul oxidativ indus de H_2O_2 și $HOCl$ (Huang și colab, 2003). Prin mecanismul menționat mai sus, suplimentarea cu ARW a arătat următoarele beneficii potențiale: îmbunătățirea sănătății tractului digestiv (Koseki și colab, 2007); atenuarea severității bolilor in vivo (Lee și colab, 2009); îmbunătățirea stării corporale a subiecților în vârstă (Yang și colab, 2007). Cu toate acestea, procesul și mecanismele precise prin care ARW contribuie la îmbunătățirea și prevenirea bolilor nu au fost pe deplin înțelese. În conformitate cu aceasta, efectele ARW au fost confirmate, iar mecanismul său de acțiune a fost evaluat, în mai multe modele, inclusiv modele animale și clinice. În mod specific, au fost investigate potențialele beneficii ale ARW asupra răspunsului imun, inclusiv efectul acestuia asupra echilibrului dintre activarea Th1 și Th2

(Yang și colab, 2007). Unele studii au sugerat că ARW ar putea provoca modificări ale activității metabolice in vivo (Vorobjeva, 2005).

În același timp, ARW prezintă un pH mai mare decât apa de la robinet. Consumul de ARW ar fi benefic nu numai în bolile gastrointestinale, ci și în pH-ul sângelui. Se știe că pH-ul ridicat al apei alcaline, afectează gruparea moleculelor de apă, producând grupuri de apă mai mici care ar putea permite apei cu conținut scăzut de alcalii să intre eficient în celulă, să mărească hidratarea intracelulară, să elimine deșeurile și să prevină utilizarea inutilă. (Yoon și colab, 2011). Până acum, aceste rezultate au întărit și mai mult concluziile lui Kim și Yokoyama (1997) și Watanabe și colab. (1997), care au descoperit că suplimentarea pe termen lung cu ARW a normalizat nivelurile anormale de glucoză din sânge și lipide. În plus, Li și colab. (2011) au raportat recent că ARW a prevenit apoptoza celulelor β pancreatice și că ingestia pe termen lung a ARW a încetinit dezvoltarea simptomelor într-un model de șoarece de diabet zaharat de tip 1, prevenind generarea de specii reactive de oxigen derivate din alloxan. Studiile anterioare au demonstrat, de asemenea, că ARW protejează împotriva acumulării de lipide și colesterol în organism (Jin și colab, 2006a; Jin și colab, 2006b). Ignacio și colaboratorii (Ignacio și colab, 2013; Ignacio și colab, 2014) au conceput studii pentru a confirma efectele ARW în bolile legate de acumularea de grăsime, cum ar fi obezitatea. Se crede că profilarea imunității, inclusiv rețeaua Th1/Th2 și profilarea citokinelor, este importantă în tratamentul bolilor inflamatorii, cum ar fi obezitatea (Yoon și colab, 2011). Intervențiile terapeutice, cum ar fi cele cu ARW, cu citokine specifice de tip antiinflamator/Th-2, furnizează dovezi promițătoare ca tratament împotriva răspunsului proinflamator în exces în obezitate. Pe lângă aceasta, apa alcalină facilitează dezintegrarea lipidelor. Aceste rezultate au fost susținute de profilurile lipidice ale șoarecilor: colorarea cu roșu ulei O a arătat că consumul de ARW a redus acumularea de grăsime în ficat. Mai mult, datele moleculare au arătat că suplimentarea cu ARW a indus expresia genei CYP7A1, care codifică colesterolul 7 α -hidroxilaza, primul pas și limitator de viteză în calea sintetică a acidului biliar, locul principal de reglare și mecanismul principal pentru eliminarea colesterolului din organism (Pullinger și colab, 2002). Pe baza acestor rezultate, se pare că ARW exercită efecte anti-obezitate prin inducerea CYP7A1, care joacă un rol critic în homeostazia colesterolului în organism. Cercetările din ultimele decenii au evidențiat intervenția ROS în sănătate și boli. În general, există o asocierie între eliberarea proteinelor citotoxice, producerea de ROS, inflamație și dominanța citokinelor imune.

Conform studiilor clinice care au implicat ARW administrat oral pentru tratamentul bolii senile și recuperarea pacienților internați, nu au existat efecte

distincte pozitive sau negative la pacienții în vârstă (Yang si colab, 2007). Cu toate acestea, toți parametrii sângelui măsurați au fost în limitele lor normale, inclusiv leucocite, adiponectină, colesterol, potasiu și enzime hepatice asociate cu metabolismul lipidic (Kim & Kim, 2006). Prin urmare, s-ar putea concluziona că ARW nu induce efecte adverse și ar putea duce la o stare corporală favorabilă. Consumul de ARW ar putea duce la proprietăți potențial benefice de promovare a sănătății. Apa bună nu ar trebui să fie doar lipsită de poluanți, ci să aibă și efecte benefice asupra sănătății, cum ar fi capacitatea de a detoxifica sângele, de a întări sistemul imunitar și de a contracara radicalii liberi nocivi. Tendința articolelor recente cu privire la efectul ARW asupra diferitelor boli ale stilului de viață s-a dovedit a fi semnificativă, date care arată că există o scădere semnificativă a obezității induse de dieta bogată în grăsimi și a colesterolului total, precum și profiluri lipidice îmbunătățite ale indivizilor. Luată împreună, apa alcalină cu un pH între 8 și 10 are un feedback pozitiv asupra diabetului și obezității, precum și un efect sinergic asupra modificării stilului de viață, cum ar fi exercițiile fizice. Poate reduce stresul oxidativ și biomarkerii inflamatori și poate elimina și inhiba producția de ROS, crescând astfel nivelurile de antioxidanți. De asemenea, îmbunătățește starea de hidratare și echilibrul acido-bazic, reducând perturbările în conținutul de electroliți al fluidelor și accelerând rata metabolismului.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Aguilar F., Autrup H., Barlow S., Castle L., Crebelli R., Dekant W., Engel N., Gontard D., Gott S., Grilli R., Gurtler J.C., Larsen C., Leclercq J.C., Leblanc F.X., Malcata W., Mennes M.R., Milana I., Pratt I., Rietjens I., Tobback P., Toldra F. (2008). Scientific opinion of the panel on food additives, flavorings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission on selenium-enriched yeast as source for selenium. *EFSA J.*, 766:1–43.
- Aiuchi T., Nakajo S., Nakaya K. (2004). Reducing activity of colloidal platinum nanoparticles for hydrogen peroxide. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical and 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 736–738.
- Akter S., Eguchi M., Kurotani K., Kochi T., Pham N.M., Ito R., Kuwahara K., Tsuruoka H., Mizoue T., Kabe I., Nanri A. (2015). High dietary acid load is associated with increased prevalence of hypertension: the Furukawa Nutrition and Health Study. *Nutrition*, 31:298–303.
- Akter S., Eguchi M., Kuwahara K., Kochi T., Ito R., Kurotani K., Tsuruoka H., Nanri A., Kabe I., Mizoue T. (2016). High dietary acid load is associated with insulin resistance: the Furukawa Nutrition and Health Study. *Clin Nutr*, 35:453–9.
- Albina P., Durban N., Bertron A., Albrecht A., Robinet J.C., Erable B. (2019). Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 5163.
- Alexy T., Wenby R.B., Pais E., Goldstein L.J., Hogenauer W., Meiselman H.J. (2005). An automated tube-type blood viscometer: validation studies. *Biorheology*. 42(3):237–47.
- Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. (2016). Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J. Visual. Exp.* 53936.
- American Institute for Cancer Research. Questions about body pH and Cancer. 2012. <http://www.aicr.org/press/health-features/nutrition-wise/nw-questions-about-body-ph-and-cancer-mets-stevia.html> (accessed 27 Jul 2015).

- Armstrong L.E. (2007) Assessing hydration status: the elusive gold standard. *J Am Coll Nutr.* 26(5 Suppl):575s–84s.
- Astigiano S., Puglisi A., Mastracci L., Fais S., Barbieri O. (2017). Systemic alkalisation delays prostate cancer cell progression in TRAMP mice. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32:363–8.
- Aunan J.R., Cho W.C., Sørreide K. (2017). The biology of aging and cancer: a brief overview of shared and divergent molecular hall marks. *Aging Dis.*, 8:628.
- Aune D., Chan D.S.M., Greenwood D.C., Vieira A.R., Navarro Rosenblatt D.A., Vieira R., Norat T. (2012). Dietary fiber and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol*, 23:1394–402.
- Axell T. (1993) Oral mucosal changes related to smokeless tobacco usage: Research findings in Scandinavia. *Oral Oncol., Eur. J. Cancer* 29B (4), 299-302.
- Ayers R.S., Westcot D.W. (1985). Water quality for agriculture. *FAO Irrigation and Drainage Paper* 29 Rev. 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Barrett-Lennard E.G. (2003). The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: Causes, consequences and implications. *Plant Soil* 253: 35–54.
- Baskurt O.K., Meiselman H.J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 29(5):435–50.
- Beckman K.B., Ames B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78, 547–581.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300
- Berneis K., Keller U. (2000). Bioelectrical impedance analysis during acute changes of extracellular osmolality in man. *1. 19(5):361–6.*
- Boekema J. P., Samsom M., van Berge G. P. (2009). Coffee and Gastrointestinal Function: Facts and Fiction: A Review. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34:35-39, <https://doi.org/10.1080/003655299750025525>
- Brauns, J.; Turek, T. (2020). Alkaline water electrolysis powered by renewable energy: A review. *Processes* 8, 248.
- Brunnemann K.D., Hoffmann D. (1972) The pH of tobacco smoke. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 12, 115-124.
- Buclin T., Cosma M., Appenzeller M., Jacquet A.F., Decosterd L.A., Biollaz J., Burckhard P. (2001). Diet acids and alkalis influence calcium retention in bone. *Osteoporos Int*, 12:493–9.
- Burroni D., Ceccarini C. (1984) The effect of alkaline pH on cell growth of six different mammalian cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.* 150, 505-507.
- Carter C.T., Grieve C.M (2008). Mineral nutrition, growth, and germination of *Antirrhinum majus* L. (snapdragon) when produced under increasingly saline conditions. *Hort Science* 43: 710–718.
- Cefalu C.A. (2011). Theories and mechanisms of aging. *Clin. Geriatric Med.*, 27:491–506.
- Chan J.C. (1983) Acid-base disorders and the kidney. *Adv. Pediatr.* 30, 401-471.
- Cheon H.G., Kim H.J., Mo H.K., Yoo S.E., Lee B.H. (1999) Anti-ulcer activity of SKP-450, a novel potassium channel activator in rats. *Pharm. Res.* 40 (3), 243-248.
- Cheung H.S., McCarty D.J. (1985) Mitogenesis induced by calcium-containing crystals. Role of intracellular dissolution. *Exp. Cell Res.* 157, 63-70.
- Cheuvront S.N., Ely B.R., Kenefick R.W., Sawka M.N. (2010). Biological variation and diagnostic accuracy of dehydration assessment markers. *Am J Clin Nutr.* 92(3):565–73.
- Cheuvront S.N., Kenefick R.W., Montain S.J., Sawka M.N. (2010). Mechanisms of aerobic performance impairment with heat stress and dehydration. *J Appl Physiol.* 109(6):1989–95.
- Cocklet G., Meiselman H. (2007) Blood rheology. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. Ios Press. Washington, DC.
- Collett D. *Modelling Survival Data in Medical Research, Texts in Statistical Science*. Chapman & Hall/CRC, 3rd edition, 2014.
- Corrett N. (2015). Le Regime Alcalin. Paris: Larousse.
- Cox S.C., Walker D.M. (1996) Oral submucosis fibrosis. *A Rev. Aust. Dent. J.* 41 (5), 294-299.
- David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varna Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. (2014). Diet rapidly and

- reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563, <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- DeFronzo R.A., Beckles A.D. (1979). Glucose intolerance following chronic metabolic acidosis in man. *The American journal of physiology* 236, E328–334
 - Department of the Ministry of Health, Labour and Welfare, Pharmaceutical Announcement. Bulletin of the Monitoring and Guidance; Ministry of Health, Labour and Welfare: Tokyo, Japan, 1965; Volume 763.
 - Department of the Ministry of Health, Labour and Welfare, Pharmaceutical Monitoring. Bulletin of the Monitoring and Guidance; Ministry of Health, Labour and Welfare: Tokyo, Japan, 1992; Volume 57.
 - Depondt J., Shabana A., Sawaf H., Gehanno P., Forest N. (1999) Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. A prospective study. *Eur J. Oral Sci.* 107, 442-454.
 - Devitt D.A., Morris R.L. (1987). Morphological response to flowering annuals to salinity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 951–955.
 - Dole M., Wilson F.R., Fife W.P. (1975). Hyperbaric hydrogen therapy: A possible treatment of cancer. *Science*, 190, 152–154.
 - Dominguez D. C. (2004). Calcium signaling in bacteria. *Mol. Microbiol.* 54, 291–297, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04276.x>
 - Drobnik M. (2000). Evaluation of pharmacodynamic properties of medium-mineralized alkaline water designed for distribution as bottled natural mineral water. *Rocz Pań stwowego Zakladu Hig.* 51:379–84.
 - Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82, 47–95.
 - Duselis A.R. și Vrana P.B. (2007) Retrieval of mouse oocytes. *J. Visual. Exp.*, 185.
 - Dwyer J., Foulkes E., Evans M., Ausman L. (1985). Acid/alkaline ash diets: time for assessment and change. *J Am Diet Assoc*, 85:841–5.
 - Eagle H. (1973) The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J. Cell Physiol.* 82, 1-8.
 - Elder A., Yang H., Gwiazda R., Teng X., Thurston S., He H., Oberdörster G. (2007). Testing nanomaterials of unknown toxicity: An example based on platinum nanoparticles of different shapes. *Adv. Mater.*, 19, 3124–3129.
 - Engberink M.F., Bakker S.J.L., Brink E.J., van Baak M.A., van Rooij F.J.A., Hofman A., Witteman J.C.M., Geleijnse J.M. (2012). Dietary acid load and risk of hypertension: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr*, 95:1438–44.
 - Evans G.H., Shirreffs S.M., Maughan R.J. (2009). Postexercise rehydration in man: the effects of osmolality and carbohydrate content of ingested drinks. *Nutrition*. 25(9):905–13.
 - Fagherazzi G., Vilier A., Bonnet F., Lajous M., Balkau B., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F. (2013). Dietary acid load and risk of type 2 diabetes: the E3N-EPIC cohort study. *Diabetologia* 57, 313–320, <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3100-0>
 - Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., Wang J., Darzi Y., Faust K., Kurilshikov A., Bonder M.J., Valles-Colomer M., Vandeputte D., Tito R.Y., Chaffron S., Rymenans L., Verspecht C., De Sutter L., Lima-Mendez G., D'hoel K., Jonckheere K., Homola D., Garcia R., Tigchelaar E.F., Eeckhaudt L., Fu J., Henckaerts L., Zhernakova A., Wijmenga C., Raes J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352, 560–564, <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
 - Faul F., Erdfelder E., Lang A. G., Buchner A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods*. 39, 175–191
 - Fenton T.R., Huang T. (2016). Systematic review of the association between dietary acid load, alkaline water and cancer. *BMJ Open*, 6. e010438. doi:10.1136/bmjopen-2015-010438
 - Fenton T.R., Lyon A.W., Eliasziw M., Tough S.C., Hanley D.A. (2009). Phosphate decreases urine calcium and increases calcium balance: a meta-analysis of the osteoporosis acid-ash diet hypothesis. *Nutr J*, 8:41.
 - Fenton T.R., Tough S.C., Lyon A.W., Eliasziw M., Hanley D.A. (2011). Causal assessment of dietary acid load and bone disease: a systematic review & meta-analysis applying Hill's epidemiologic criteria for causality. *Nutr J*, 10:41.

- Forero D.A., Gonzalez-Giraldo Y., Lopez-Quintero C., Castro-Vega L.J., Barreto G.E., Perry G. (2016). Meta-analysis of telomere length in Alzheimer's disease. *The Journals of Gerontology: Series A*, 71:1069–73.
- Forslund K., Hildebrand F., Nielsen T., Falony G., Le Chatelier E., Sunagawa S., Prifti E., Vieira-Silva S., Gudmundsdottir V., Krogh Pedersen H., Arumugam M., Kristiansen K., Voigt A.Y., Vestergaard H., Hercog R., Costea P.I., Kultima J.R., Li J., Jørgensen T., Levenez F., Dore J., MetaHIT consortium†, Nielsen H.B., Brunak S., Raes J., Hansen T., Wang J., Ehrlich S.D., Bork P., Pedersen O. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528, 262–266, <https://doi.org/10.1038/nature15766>
- Franks L.M., Payne J. (1970). The influence of age on reproductive capacity in C57BL mice. *J. Reprod. Fertil.*, 21:563–5.
- Frassetto L.A., Todd K.M., Morris R.C. Jr., Sebastian A. (1998). Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein contents. *The American journal of clinical nutrition* 68, 576–583
- Fridovich I. (1995). Superoxide radicals and superoxidedismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97–112.
- Gadek Z., Shirahata S. (2002). Changes in the Relevant Test Parameters of 101 Diabetes Patients under the Influence of the So-Called “Nordenau-Phenomenon”. In *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, Volume 12, pp. 427–431.
- Gallardo-Williams M.T., Maronpot R.R., Turner C.H., Johnson C.S., Harris M.W., Jayo M.J., Chapin R.E. (2003). Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 93:155–70.
- Galloway A. (1991). *The evolutionary biology of aging*. Oxford University Press. New York.
- Gasbarrini G., Arienti V., Magri F., Boriani L., Ugenti F., Belotti M. (1991). Effects of bicarbonated alkaline water (Uliveto) on gastric and gallbladder emptying in normal subjects. Ultrasonic evaluation. *Minerva Med.*, 82:59–62.
- Ge Y., Wu S., Xue Y., Tao J., Li F., Liu H., Ma W., Zhao Y. (2016). Preferential extension of short telomeres induced by low extracellular pH. *Nucleic Acids Res.*, 44:8086–96.
- Gharib B., Hanna S., Abdallahi O.M.S., Lepidi H., Gardette B., de Reggi M. (2001). Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: Investigation on parasite-induced inflammation. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris Life Sci.*, 324, 719–724.
- Gillies R.J., Pilot C., Marunaka Y., Fais S. (2019). Targeting acidity in cancer and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Rev. Cancer*, 1871:273–80.
- Gillies R.J., Raghunand N., Garcia-Martin M.L., Gatenby R.A. (2004). pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 23:57–64.
- Golfinopoulos S.K., Nikolaou A.D. (2005). Survey of disinfection by-products in drinking water in Athens, Greece. *Desalination*, 176, 13–24.
- Gonzalez-Alonso J., Mora-Rodriguez R., Below P.R., Coyle E.F. (1995). Dehydration reduces cardiac output and increases systemic and cutaneous vascular resistance during exercise. *J Appl Physiol.* 79(5):1487–96.
- Gothia Tobak (1999) Snusets inneha. Go. Göteborg: Swedish Match.
- Grattan S.R., Grieve C.M. (1999). Salinity– mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Hort.* 78: 127–157.
- Greenway H., Munns R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149–190.
- Grieve C.M., Poss J.A., Grattan S.R., Shouse P.J., Lieth J.H., Zeng L. (2005). Productivity and mineral nutrition of Limonium species irrigated with saline wastewaters. *HortScience* 40: 654– 658.
- Guariguata, L. et al. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* 103, 137–149, <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
- Guyatt G.H., Oxman A.D., Sultan S., Glasziou P., Akl E.A., Alonso-Coello P., Atkins D., Kunz R., Brozek J., Montori V., Jaeschke R., Rind D., Dahm P., Meerpohl J., Vist G., Berliner E., Norris S., Falck-Ytter Y., Murad M.H., Schünemann H.J. (2011). GRADE guidelines: 9. Rating up the quality of evidence. *J Clin Epidemiol*, 64:1311–16.
- Halliwell B., Gutteridge J. (1999). *Free radicals in medicine and biology*. Oxford: Clarendon.

- Hamasaki T., Kashiwagi T., Imada T., Nakamichi N., Aramaki S., Toh K., Morisawa S., Shimakoshi H., Hisaeda Y., Shirahata S. (2008). Kinetic analysis of superoxide anion radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles. *Langmuir*, 24, 7354–7364.
- Hanakoa K. (2001). Antioxydant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chlorid solutions. *J. Appl. Electrochem*, 31, 1307–1313.
- Hanaoka K., Sun D., Lawrence R., Kamitani Y., Fernandes G. (2004). The mechanism of the enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. *Biophys. Chem.*, 107, 71–82.
- Hanaoka K., Sun D., Lawrence R., Kamitani Y., Fernandes G. (2004). The mechanism of the enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. *Biophysical Chemistry*, vol. 107, no. 1, pp. 71–82.
- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17, 315–325.
- Hansen T.H., Thomassen M.T., Madsen M.L., Kern T., Bak E.G., Kashani A., Allin K.H., Hansen T., Pedersen O. (2018). The effect of drinking water pH on the human gut microbiota and glucose regulation: results of a randomized controlled cross-over intervention. *Sci. Rep.*, 8(1):16626. doi: 10.1038/s41598-018-34761-5.
- Hayashi H. (1995). Water the chemistry of life, Part IV. *Explore*, 6, 28–31.
- Heil D., Seifert J. (2009). Influence of bottled water on rehydration following a dehydrating bout of cycling exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 6 Suppl 1:1–2.
- Heil D.P. (2010). Acid-base balance and hydration status following consumption of mineral-based alkaline bottled water. *J Int Soc Sports Nutr.* 7:29.
- Heil D.P., Jacobson E.A., Howe S.M. (2012) Influence of an alkalinizing supplement on markers of endurance performance using a double-blind placebo-controlled design. *J Int Soc Sports Nutr.* 9:8.
- Helft P.R., Hlubocky F., Daugherty C.K. (2003). American oncologists' views of internet use by cancer patients: a mail survey of American Society of Clinical Oncology members. *J Clin Oncol*, 21:942–7.
- Hemann M.T., Strong M.A., Hao L.Y., Greider C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, 107:67–77.
- Henry M. și Chambron J. (2013). Physico-Chemical, Biological and Therapeutic Characteristics of Electrolyzed Reduced Alkaline Water (ERAW). *Water*, 5: 2094-2115; doi:10.3390/w5042094
- Higgins J., Green S., eds. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1.0. 2011. <http://www.cochrane-handbook.org>
- Hinckley A.F., Bachand A.M., Reif J. S. (2005). Late pregnancy exposures to disinfection by-products and growth-related birth outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1808–1813.
- Hiraoka A., Takemoto M., Suzuki T., Shinohara A., Chiba M., Shirao M., Yoshimura Y. (2004). Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of active hydrogen. *J. Health Sci.*, 50, 456–465.
- Hirsch J.M., Johansson S.L. (1983) Effects of long-term application of snuff on the mucosa an experimental study in the rat. *J. Oral Pathol.* 12, 187-198.
- Hirsch M. (1983) Snuff induced lesions. A clinical and experimental study. Thesis. Gothenburg.
- Hirvikoski P., Tammi R., Kumpulainen E. Et Al. (1999) Irregular expression of hyaluronan and its CD44 receptor is associated with metastatic phenotype in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 434, 37-44.
- Holsworth Jr R.E., Cho Y.I., Weidman J. (2014). Effect of hydration on whole blood viscosity in firefighters. *Altern Ther Health Med.* 19(4):44–9.
- Hooper L., Bunn D., Jimoh F.O., Fairweather-Tait S.J. (2014). Water-loss dehydration and aging. *Mechan. Ageing. Dev.*, 136–137: 50–8.
- Howell J.M. (1986) Alkaline ingestions. *Ann. Emerg Med.* 15 (7), 820-825.
- Huang K.C., Yang C.C., Hsu S.P., Lee K.T., Liu H.W., Morisawa S., Otsubo K., Chien C.T. (2006). Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney Int.*, 70, 391–398.
- Huang Z.T., Cox D.A. (1988). Salinity effects on annual bedding plants in a peat-perlite medium and solution culture. *J. Plant Nutr.* 11: 145–159.

- Huang, K.-C.; Yang, C.-C.; Lee, K.-T.; Chien, C.-T. (2003). Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int.* 64, 704–714.
- Huang, Y.-R.; Hung, Y.-C.; Hsu, S.-Y.; Huang, Y.-W.; Hwang, D.-F. (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19, 329–345.
- Huebner J., Marienfeld S., Abbenhardt C., Ulrich C., Muenstedt K., Micke O., Muecke R., Loeser C. (2014). Counseling patients on cancer diets: a review of the literature and recommendations for clinical practice. *Anticancer Res.* 34:39–48.
- Hunter K.A.M., Wu L. (2005). Morphological and physiological response of five California native grass species to moderate salt spray: Implications for landscape irrigation with reclaimed water. *J. Plant Nutr.* 28: 247–270.
- Idris A.M., Warnakulasuriya K.A.A.S., Ibrahim Y.M. Et Al. (1996) Toombak-associated oral mucosal lesions in Sudanese show a low prevalence of epithelial dysplasia. *J. Oral Pathol. Med.* 25, 239-244.
- Ignacio, R.M.C.; Kang, T.-Y.; Kim, C.-S.; Kim, S.-K.; Yang, Y.-C.; Sohn, J.-H.; Lee, K.-J. (2013). Anti-obesity effect of alkaline reduced water in high fat-fed obese mice. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1052–1059.
- Ignacio, R.M.C.; Kim, C.S.; Kim, S.K. (2014). Immunological profiling of obesity. *J. Lifestyle Med.* 4, 1–7.
- Ioannidis J.P. (2013). Implausible results in human nutrition research. *BMJ*, 347: f6698.
- Ioannidis J.P., Loy E.Y., Poulton R., Chia K.S. (2009). Researching genetic versus nongenetic determinants of disease: a comparison and proposed unification. *Sci Transl Med*, 1:7ps8.
- Isobe Y., Yamauchi M., Ikeda R., Kitagawa H. (2003). A study on hydrogen adsorption of polymer protected Pt nanoparticles. *Synth. Met.*, 135–136, 757–758.
- Itoh T., Hamada N., Terazawa R., Ito M., Ohno K., Ichihara M., Nozawa Y. (2011). Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon γ -induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411, 143–149.
- Jackson M.A., Goodrich J.K., Maxan M.E, Freedberg D.E., Abrams J.A., Poole A.C., Sutter J.L., Welter D., Ley R.E., Bell J.T., Spector T.D., Steves C.J. (2016). Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut*, 65:749-756. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310861>
- Jaquet M., Rochat I., Moulin J., Cavin C., Bibiloni R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *Int. J. Food. Microbiol.*, 130:117–121, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.011>
- Jelenik T., Séquaris G., Kaul K., Ouwens D.M., Phielix E., Kotzka J., Knebel B., Weiß J., Reinbeck A.L., Janke L., Nowotny P., Partke H.J., Zhang D., Shulman G.I., Szendroedi J., Roden M. (2014). Tissue-specific differences in the development of insulin resistance in a mouse model for type 1 diabetes. *Diabetes* 63, 3856–3867, <https://doi.org/10.2337/db13-1794>
- Jeng J.H., Kuo M.L., Hahn L.J., Kuo M.Y.P. (1994) Genotoxic and non-genotoxic effects of Betel quid ingredients on oral mucosal fibroblasts in vitro. *J. Dent Res.* 73 (5), 1043-1049.
- Jin D., Ryu S.H., Kim H.W. et al. (2006). Anti-diabetic effect of alkaline-reduced water on OLETF rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 31–37.
- Jin D., Ryu S.H., Kim H.W., Yang E.J., Lim S.J., Ryang Y.S., Chung C.H., Park S.K., Lee K.J. (2006). Anti-diabetic effect of alkaline-reduced water on OLETF rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 31–37.
- Jin K. (2010). Modern biological theories of aging. *Aging Dis.*, 1: 72–4.
- Jin Y.-T., Tsai S.T., Wong T.Y., Chen F.F., Chen R.M.Y. (1996) Studies on promoting activity of Taiwan betel quid ingredients in hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Oncol. Eur J. Cancer* 32 (5), 343-346.
- Jin, D.; Park, S.K.; Lee, Y.M.; Yoon, Y.S.; Kim, D.H.; Deung, Y.K.; Lee, K.J. (2006a). Effect of mineral-induced alkaline reduced water on sprague-dawley rats fed on high-fat diet. *J. Exp. Biomed. Sci.* 12, 1–7
- Jin, D.; Ryu, S.H.; Kim, H.W.; Yang, E.J.; Lim, S.J.; Ryang, Y.S.; Chung, C.H.; Park, S.K.; Lee, K.J. (2006b). Anti-diabetic effect of alkaline-reduced water on OLETF rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 31–37.
- Johnston T.E., Tedesco P.M., Lithgow G.J. (1993). Comparing mutants, selective breeding, and transgenic in the dissection of aging processes of *Caenorhabditis elegans*. *Genetica*, 91, 65–77.
- Jones D. (1996). Gas therapy. *Nature*, 383, 676.
- Kajiyama S., Hasegawa G., Asano M., Hosoda H., Fukui M., Nakamura N., Kitawaki J., Imai S., Nakano K., Ohta M., Adachi T., Obayashi H., Yoshikawa T. (2008). Supplementation of hydrogen-rich

- water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr. Res.*, 28, 137–143.
- Kalman D.S., Feldman S., Krieger D.R., Bloomer R.J. Comparison of coconut water and a carbohydrate-electrolyte sport drink on measures of hydration and physical performance in exercise-trained men. *J Int Soc Sports Nutr.* 9(1):1.
 - Kaneko Y., Hashimoto Y., Shiota M. et al. (1993): Reproductive and developmental toxicity studies of clonidine (III): Perinatal and postnatal study by subcutaneous administration in rats. *Iyaku hin kenkyu*, 2, 953-968.
 - Kang K.M., Kang Y.N., Choi I.B., Gu Y., Kawamura T., Toyoda Y., Nakao A. (2011). Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors. *Med. Gas Res.*, 1, doi:10.1186/2045-9912-1-11.
 - Karlsson F.H., Tremaroli V., Nookaew I., Bergstrom G., Behre C.J., Fagerberg B., Nielsen J., Backhed F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498 99–103
 - Kawai M., Enomoto S., Suzuki H. et al. (1985): Reproductive study of KM 2210 (Bestrabucil): Perinatal and postnatal study in rats. *Kiso to rinsyo*, 19, 171-206.
 - Kiefe-de Jong J.C., Li Y., Chen M., Curhan G.C., Mattei J., Malik V.S., Forman J.P., Franco O.H., Hu F.B. (2017). Diet-dependent acid load and type 2 diabetes: pooled results from three prospective cohort studies. *Diabetologia* 60, 270–279, <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4153-7>
 - Kim J., Chung Y., Shin D., Kim M., Lee Y., Lim Y., Lee D. (2003). Chlorination by-products in surface water treatment process. *Desalination*, 151, 1–9.
 - Kim J., Shirasawa Y., Miyamoto Y. (2010). The effect of TAT conjugated platinum nanoparticles on lifespan in a nematode *Caenorhabditis elegans* model. *Biomaterials*, 31, 5849–5854.
 - Kim J., Takahashi M., Shimizu T., Shirasawa T., Kajita M., Kanayama A., Miyamoto Y. (2008). Effects of a potent antioxidant platinum nanoparticle on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* mechanisms of ageing and development. *Mech. Ageing Dev.*, 129, 322–331.
 - Kim, J.M.; Kazuhito, Y. (1997). Effects of alkaline ionized water on spontaneously diabetic GK-rats fed sucrose. *Korean J. Lab. Anim. Sci. Korea Repub.* 13, 187–190.
 - Kim, M.J.; Kim, H.K. (2006). Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice. *Life Sci.* 79, 2288–2292.
 - King A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* 166, 877–894, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
 - Kirkwood T.B.L., Kowald A. (2012). The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *BioEssays*, 34:692–700.
 - Kisker C., Schindelin H., Baas D., Rétey J., Meckenstock R.U., Kroneck P.M.H. (1998). A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22:503–21.
 - Komatsu T., Kabayama S., Hayashida A., Nogami H., Teruya K., Katakura Y., Otsubo K., Morisawa S., Shirahata S. (2001). Suppressive Effect of Electrolyzed Reduced Water on the Growth of Cancer Cells and Microorganisms. In *Animal Cell Technology: From Target to Market*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp. 220–223.
 - Koseki, M.; Tanaka, Y.; Noguchi, H.; Nishikawa, T. (2007). Effect of PH on the taste of alkaline electrolyzed water. *J. Food Sci.* 72, S298–S302.
 - Krapf R., Glatz M., Hulter H.N. (1995). Neutral phosphate administration generates and maintains renal metabolic alkalosis and hyperparathyroidism. *Am J Physiol*, 268: F802–7.
 - Kuchida K., Takimoto M., Yamagishi T. et al. (1993): The influence of electrified alkaline calcium water on Japanese shortpork beef meat color. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, 64, 71-73.
 - Kujala-Raè Ty K., Hiisvirta L., Kaukonen M., Liponkoski M., Sipilä A. (1998) Talousveden laatu Suomessa 1996. Suomen ympäristö, luonto ja luonnonvarat. SYKE 1998; (Nro181).
 - Kuo M.Y.P., Cheng S.J., Chen H.M. Et Al. (1998) Expression of CD44s, CD44v5, CD44v6, and CD44v7-8 in betel quid chewing associated oral premalignant lesions and squamous cell carcinomas in Taiwan. *J. Oral Pathol. Med.* 27, 428-433.
 - Lee M.M., Shen J.M. (2008). Dietary patterns using traditional Chinese medicine principles in epidemiological studies. *Asia Pac J Clin Nutr.* 17(Suppl 1):79–81.

- Lee, K.J.; Jin, D.; Chang, B.S.; Teng, Y.C.; Kim, D.H. (2009). The immunological effects of electrolyzed reduced water on the echinostoma hortense infection in C57BL/6 mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 456–462.
- Lendowski L., Färber H., Holy A., Darius A., Ehrich B., Wippermann C., Küfner B., Exner M. (2015). Accidental contamination of a German town's drinking water with sodium hydroxide. *Int J Hyg Environ Health*, 218:366–9.
- Li, Y.; Hamasaki, T.; Nakamichi, N.; Kashiwagi, T.; Komatsu, T.; Ye, J.; Teruya, K.; Abe, M.; Yan, H.; Kinjo, T.; et al. (2011). Suppressive effects of electrolyzed reduced water on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. *Cytotechnology* 63, 119–131.
- Logozzi M., Mizzone D., Di Raimo R., Andreotti M., Macchia D., Spada M., Fais S. (2020). In vivo antiaging effects of alkaline water supplementation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 657–664. doi:10.1080/14756366.2020.1733547
- Logozzi M., Mizzone D., Di Raimo R., Macchia D., Spada M., Fais S. (2019). Oral administration of fermented papaya (FPP®) controls the growth of a murine melanoma through the in vivo induction of a natural antioxidant response. *Cancers*, 11:118.
- Maalouf N.M., Cameron M.A., Moe O.W., Adams-Huet B., Sakhaee K. (2007). Low urine pH: a novel feature of the metabolic syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 2, 883–888. <https://doi.org/10.2215/cjn.00670207>
- Magro M., Corain L., Ferro S., Baratella D., Bonaiuto E., Terzo M., Corraducci V., Salmaso L., Vianello F. (2016) Alkaline water and longevity: a murine study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–6. doi:10.1155/2016/3084126
- Magro M., Corain L., Ferro S., Baratella D., Bonaiuto E., Terzo M., Corraducci V., Salmaso L., Vianello F. (2016). Alkaline water and longevity: a murine study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016:1–6.
- Mandel I.D. (1987) The functions of saliva. *J. Dent. Res.* 66 (Spec iss): 623-627.
- Marra J. (2014). Cause, cure, and cancer free: how I became a cancer free escapee. Sakura Publishing and Technologies, Pennsylvania.
- Martin D.G., Ferguson E.W., Wigutoff S., Gawne T., Schoomaker E.B. (1985). Blood viscosity responses to maximal exercise in endurance-trained and sedentary female subjects. *J Appl Physiol.* 59(2):348–53.
- Martin W., Baross J., Kelley D., Russel M.J. (2008). Hydrothermal Vents and the origin of life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 805–814.
- Martinovich G.G., Cherenkevich S.N., Sauer H. (2005). Intracellular redox state. Towards quantitative description. *Eur. Biophys. J.*, 34, 937–942.
- Matsuura T., Kurio W., Fujishima H. et al. (1993): Perinatal and postnatal study of Trandolapril (RU44570) in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 18, 133-159.
- Matsuura T., Kurio W., Maeda H. et al. (1993): Teratological study of Trandolapril (RU44570) in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 18, 107-132.
- Maurer M., Riesen W., Muser J., Hulter H.N., Krapf R. (2003). Neutralization of Western diet inhibits bone resorption independently of K intake and reduces cortisol secretion in humans. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284:32–40.
- McCarty M.F., Whitaker J. (2010). Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. *Altern Med Rev*, 15:264–72.
- McInnes E.F. *Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas*. Saunders Elsevier, 2012.
- Merne M. E., Syrjänen K. J., Syrjänen S. M. (2001). Systemic and local effects of long-term exposure to alkaline drinking water in rats. *International journal of experimental pathology*, 82(4), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2001.iep0082-0213-x>
- Merne M.E., Syrjänen K.J., Syrjänen S.M. (2001). Systemic and local effects of long-term exposure to alkaline drinking water in rats. *Int J Exp Pathol*, 82:213–19.
- Montain S.J., Coyle E.F. (1992). Influence of graded dehydration on hyperthermia and cardiovascular drift during exercise. *J Appl Physiol.* 73(4): 1340–50.
- Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651–681.
- Murakami K., Sasaki S., Takahashi Y., Uenishi K. (2008). Association between dietary acid-base load and cardiometabolic risk factors in young Japanese women. *Br J Nutr.* 100(3):642–51.

- Murakami S., Goto Y., Ito K., Hayasaka S., Kurihara S., Soga T., Tomita M., Fukuda S. (2015). The Consumption of Bicarbonate Rich Mineral Water Improves Glycemic Control. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2015, 824395, <https://doi.org/10.1155/2015/824395>
- Nageswari K., Banerjee R., Gupte R.V., Puniyani R.R. (2002). Effects of exercise on rheological and microcirculatory parameters. *Clin Hemorheol Microcirc.* 23(2-4):243–7.
- Nakao A., Toyoda Y., Sharma P., Evans M., Guthrie N. (2010). Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome—An open label pilot study. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 46, 140–149.
- Nakayama M., Nakano H., Hamada H.I., Ilami N., Nakazawa R., Ito S. (2010). A novel bioactive hemodialysis System using dissolved dihydrogen (H₂) produced by water electrolysis: A clinical trial. *Nephrol. Dial. Transplant*, 25, 3026–3033.
- Nau J. (1997). *Tagetes* (marigold), p. 763–766. In: Ball, V. (ed.). Ball redbook. Ball Publishing, Batavia, IL.
- Ney P.A., Christopher M.M., Hebbel R.P. (1990). Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. *Blood*. 75(5):1192–8.
- Nielsen F.H. (2000). The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 16:512–4.
- Ninomiya H., Akitsuki S. Kondo J. et al. (1989): Reproductive study of Celiprolol (3): Peri- and postnatal study in rats. *Pharmacometrics*, 37, 231-242.
- Nishikawa R., Teruya K., Katakura Y., Osada K., Hamasaki T., Kashiwagi T., Komatsu T., Li Y., Ye J., Ichikawa A., Otsubo K., Morisawa S., Xu Q., Shirahata S. (2005). Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two-stage cell transformation. *Cytotechnology*, 47, 97–105.
- Nouri M., Chalian H., Bahman A., Mola Hajian H., Ahmadi Faghih M.A., Fakheri H., Soroush A.R. (2008). Nail molybdenum and zinc contents in populations with low and moderate incidence of esophageal cancer. *Arch. Iran. Med.*, 11:392–6.
- Nwose E.U., Jelinek H.F., Richards R.S., Kerr P.G. (2007). Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *Br J Biomed Sci.* 64(1):35–43.
- Oberleithner H., Westphale H.-J., Gassner B. (1991) Alkaline stress transforms Madin-Darby canine kidney cells. *Pflügers. Arch.* 419, 418-420.
- Ohsawa G. (2012). Acid & Alkaline—an overview of pH and human health.
- Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K., Watanabe M., Nishimaki K., Yamagata K., Katsura K., Katayama Y., Asoh S., Ohta S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.*, 13, 688–694.
- Ohta S. (2011). Recent progress toward hydrogen medicine: Potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.*, 17, 2241–2252.
- Paik I.Y., Jeong M.H., Jin H.E., Kim Y.I., Suh A.R., Cho S.Y., Roh H.T., Jin C.H., Suh S.H. (2009). Fluid replacement following dehydration reduces oxidative stress during recovery. *Biochem Biophys Res Commun.* 383(1):103–7.
- Patarroyo M., Makgoba M.W. (1989) Leucocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. *Lancet* 2, 1130-1142.
- Patterson R.E., Cadmus L.A., Emond J.A., Pierce J.P. (2010). Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: a review of the epidemiologic literature. *Maturitas*, 66:5–15.
- Pedersen H. K., Gudmundsdottir V., Nielsen H.B., Hyötyläinen T., Nielsen T., Jensen B.A.H, Forslund K., Hildebrand F., Prifti E., Falony G., Le Chatelier E., Levenez F., Doré J., Mattila I., Plichta D.R., Pöhö P., Hellgren L.I., Arumugam M., Sunagawa S., Vieira-Silva S., Jørgensen T., Holm J.B., Trošt K., MetaHIT Consortium†, Kristiansen K., Brix S., Raes J., Wang J., Hansen T., Bork P., Brunak S., Oresic M., Ehrlich S.D., Pedersen O. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535, 376–381, <https://doi.org/10.1038/nature18646>
- Percy and D.H. și Barthold S.W. *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. Iowa State Press, Ames, Iowa, USA, 2nd edition, 2001.
- Pillai S.R., Damaghi M., Marunaka Y., Spugnini E.P., Fais S., Gillies R.J. (2019). Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer Metast. Rev.*, 38:205–22.

- Pullinger, C.R.; Eng, C.; Salen, G.; Shefer, S.; Batta, A.K.; Erickson, S.K.; Verhagen, A.; Rivera, C.R.; Mulvihill, S.J.; Malloy, M.J.; et al. (2002). Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J. Clin. Invest.* 110, 109–117.
- Raghunand N., Gillies R.J. (2001). pH and chemotherapy. *Novartis Found Symp*, 240: 199–211; discussion 265–8.
- Remig, V.; Franklin, B.; Margolis, S.; Kostas, G.; Nece, T.; Street, J.C. (2010). Trans fats in America: A review of their use, consumption, health implications, and regulation. *J. Am. Diet. Assoc.* 110, 585–592.
- Richards R.S., Nwose E.U. (2010). Blood viscosity at different stages of diabetes pathogenesis. *Br J Biomed Sci.* 67(2):67–70.
- Robey I.F. (2012). Examining the relationship between diet-induced acidosis and cancer. *Nutr Metab (Lond)*, 9:72.
- Sadowska-Bartosz I., Bartosz G. (2014). Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *BioMed. Res. Int.*, 2014:1–17.
- Saitoh Y., Harata Y., Mizuhashi F., Nakajima M., Miwa N. (2010). Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol. Ind. Health*, 26, 203–216.
- SAS Institute Inc. (2001). SAS/STAT software changes and enhancements through release 8.0.2. SAS Institute, Cary, NC.
- Sauers L.J., Maurer J.K. & Reer P.J. (1994) The rat as a model to evaluate the gastric irritation potential of alkaline products. *Toxicol. Pathol* 22 (3), 324-329.
- Saunders M.J., Blevins J.E., Broeder C.E. (1998). Effects of hydration changes on bioelectrical impedance in endurance trained individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 30(6):885–92.
- Sawka M.N., Burke L.M., Eichner E.R., Maughan R.J., Montain S.J., Stachenfeld N.S. (2007). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and fluid replacement. *Med Sci Sports Exerc.* 39(2): 377.
- Schulling K.D., Likis F.E. (2013). Women's gynecologic health. Sudbury (MA): Jones & Bartlett Learning.
- Schwarz G., Belaidi A.A. (2013). Molybdenum in human health and disease. Interrelations between essential metal ions and human diseases. Vol. 13. Dordrecht, Springer, p. 415–450.
- Sebastian A., Harris S.T., Ottaway J.H., Todd K.M., Morris R.C.Jr. (1994). Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal women treated with potassium bicarbonate. *N. Engl. J. Med.*, 330: 1776–81
- Segata N., Haake S.K., Mannon P., Lemon K.P., Waldron L., Gevers D., Huttenhower C., Izard J. (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome biology*, 13, R42, <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r42>
- Sens D.A., Mcguirt J.P., Khan W., Howell R.M. & Todd J.H. (1997) Expression of Hsc 70, but not Hsp 70, in human third molar dental pulp. *Eur J. Oral Sci.* 105, 271-277.
- Shammass M.A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 14:28–34.
- Sharma A., Fish B.L., Moulder J.E., Medhora M., Baker J.E., Mader M., Cohen E.P. (2014). Safety and blood sample volume and quality of a refined retro-orbital bleeding technique in rats using a lateral approach. *Lab. Anim.*, 43:63–6.
- Shay J.W., Wright W.E. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat. Rev. Genet.*, 20:299–309.
- Sherman H., Gettler A. (1912). The balance of acid-forming and base-forming elements in foods, and its relation to ammonia metabolism. *J Biol Chem*, 11:323–38.
- Shi X., Summers R.W., Schedl H.P., Flanagan S.W., Chang R., Gisolfi C.V. (1995). Effects of carbohydrate type and concentration and solution osmolality on water absorption. *Med Sci Sports Exerc.* 27(12):1607–15.
- Shimouchi A., Nose K., Shirai M., Kondo T. (2012). Estimation of molecular hydrogen consumption in the human whole body after the ingestion of hydrogen-rich water. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 737, 245–250.
- Shirahata S. (2002). Application to medical treatments of reduced water with scavenging ability for reactive oxygen species. *Kyushu Univ. Instrum. Anal. Cent. News*, 5, 7–21.

- Shirahata S., Hamasaki T., Teruya K. (2012). Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends Foods Sci. Technol.*, 23, 124–131.
- Shirahata S., Kabayama S., Nakano M. et al. (1997). Electrolyzed reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 234, no. 1, pp. 269–274.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234, 269–274.
- Shirahata S., Murakami E., Kusumoto K.I., Yamashita M., Oda M., Temya K., Kabayama S., Otsubo K., Morisawa S., Hatashi S.H., Hayashi H., Katakura T. (2002). Telomere Shortening in Cancer Cells by Electrolyzed-Reduced Water. In *Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, Volume 12, pp. 355–359.
- Shirahata, S.; Hamasaki, T.; Teruya, K. (2021). Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 124–131.
- Shirota M., Watanabe C., Nagao T. et al. (1993) : Reproductive and developmental toxicity studies of clonidine (II) : Teratogenicity study by sub cutaneous administration in rats. *Iyakuhin kenkyu*, 24, 935-952.
- Siegler J.C., Mermier C.M., Amorim F.T., Lovell R.J., McNaughton L.R., Robergs R.A. (2008). Hydration, thermoregulation, and performance effects of two sport drinks during soccer training sessions. *J Strength Cond Res.* 22(5):1394–401.
- Skimina C.A. (1992). Recycling water, nutrients and waste in the nursery industry. *HortScience* 27: 968–971.
- Smith M.M., Lucas A.R., Hamlin R.L., Devor S.T. (2015) Associatons amoung hemorrheological factors and maximal oxygen consumption. Is there a role for blood viscosity in explaining athletic performance? *Clinic Hemorrhoeol Microcirc.* 60(4):347–62.
- Smolinsky B., Eichler S.A., Buchmeier S., Meier J.C., Schwarz G. (2008). Splice-specific functions of gephyrin in molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 283:17370–9.
- Sofi M.H., Gudi R., Karumuthil-Melethil S., Perez N., Johnson B.M., Vasu C. (2014). pH of drinking water influences the composition of gut microbiome and type 1 diabetes incidence. *Diabetes* 63, 632–644, <https://doi.org/10.2337/db13-0981>
- Sofi M.H., Johnson B.M., Gudi R., Wolf K.J., Lorenz R.G., Vasu G. (2015). Response to Comment on Sof et al. pH of Drinking Water Influences the Composition of Gut Microbiome and Type 1 Diabetes Incidence. *Diabetes* 2014; 63: 632–644. *Diabetes* 64, e20–21, <https://doi.org/10.2337/db15-0554>
- Spugnini E., Fais S. (2017). Proton pump inhibition and cancer therapeutics: a specific tumor targeting or it is a phenomenon secondary to a systemic buffering? *Semin Cancer Biol.*, 43:111–8.
- Spugnini E.P., Buglioni S., Carocci F. et al. (2014). High dose lansoprazole combined with metronomic chemotherapy: a phase I/II study in companion animals with spontaneously occurring tumors. *Journal of Translational Medicine*, vol. 12, p. 225.
- Spugnini EP, Buglioni S, Carocci F, Francesco M., Vincenzi B., Fanciulli M., Fais S. (2014). High dose lansoprazole combined with metronomic chemotherapy: a phase I/II study in companion animals with spontaneously occurring tumors. *J. Transl. Med.*, 12:225.
- Stevens T.O., Mc Kinley J. (1995). lithoautotrophic microbial ecosystem in deep basalt aquifers. *Science*, 270, 450–454.
- Stoll C., Baretton G., Soost F. Et Al. (1999) Prognostic importance of the expression of splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 35, 484-489.
- Sugerman P.B., Savage N.W., Xu L.J., Walsh L.J., Seymour G.J. (1998) Heat shock protein expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, Eur J. Cancer 31, 63-67.
- Swindell W.R. (2009). Accelerated failure time models provide a useful statistical framework for aging research, *Experimental Gerontology*, vol. 44, no. 3, pp. 190–200.
- Tashiro H. (1999). Clinical Examination of Alkaline Ion Water. In *Abstract Book of Symposium: Electrolyzed Functional Ion Water*, Proceedings of 25th Meeting of Japanese Medical Association, pp. 6–7.
- Teixeira M.T., Arneric M., Sperisen P., Lingner J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and -nonextendible states. *Cell*, 117:323–35.

- Thomas S.J., MacLennan R. (1992) Slaked lime and betel nut cancer in Papua New Guinea. *Lancet* 304, 577-578.
- Tomar S.L., Henningfield J.E. (1997) Review of the evidence that pH is a determinant of nicotine dosage from oral use of smokeless tobacco. *Tobacco Control*. 6, 219-225.
- Torneck C.D., Moe H., Howley T.P. (1983) The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblast in vitro. *J. Endod.* 9, 131-136.
- Uluisik I., Karakaya H.C., Koc A. (2018). The importance of boron in biological systems. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 45:156–62.
- US EPA (2011). Integrated Risk Information System (IRIS), Safe Drinking Water Act: Consumer Confidence Reports (CCR) | US EPA, accesat la data de 15 Mai 2021
- Uyak V., Toroz I. (2007). Investigation of bromide ion effects on disinfection by-products formation and speciation in an Istanbul water supply. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 445–451
- Valdez-Aguilar L., Grieve C., Poss J. (2009). Salinity and Alkaline pH in Irrigation Water Affect Marigold Plants: I. Growth and Shoot Dry Weight Partitioning. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*. 44(6), 1719-1725. doi:10.21273/HORTSCI.44.6.1719.
- Valdez-Aguilar L.A., Reed D.W. (2007). Response of selected greenhouse ornamental plants to alkalinity in irrigation water. *J. Plant Nutr.* 30:441–452.
- Villanueva C.M., Canor K.P., Grimalt J.O., Malats N., Silverman D., Tardon A., Garcia-Closas R., Serra C., Carrato A., Castaño-Vinyals G., Marcos R., Rothman N., Real F.X., Dosemeci M., Kogevinas M. (2006). Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering and swimming in pools. *American Journal of Epidemiology*, 165, 148–156.
- Vorobjeva, N.V. (2005). Selective stimulation of the growth of anaerobic microflora in the human intestinal tract by electrolyzed reducing water. *Med. Hypotheses* 64, 543–546.
- Wanatabe T., Kishikawa Y., Shirai W. (1997). Influence of alkaline ionized water on rat erythrocyte hexokinase activity and myocardium. *J. Technol. Sci.*, 22, 141–152.
- Wang D. (2002). Dynamics of soil water and temperatures in above ground sand cultures used for screening plant salt tolerance. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 66: 1484–1491.
- Wang N., Tan H.Y., Li S., Xu Y., Guo W., Feng Y. (2017). Supplementation of micronutrient selenium in metabolic diseases: its role as an antioxidant. *Oxidat. Med. Cell. Longev.*, 2017:1–13.
- Watanabe A., Kajita M., Kim J., Kanayama A., Takahashi K., Mashino T., Miyamoto Y. (2009). In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. *Nanotechnology*, 20, doi: 10.1088/0957-4484/20/45/455105.
- Watanabe T. (1995). Effect of alkaline ionized water on reproduction in gestational and lactational rats. *The Journal of toxicological sciences*, 20(2), 135–142. <https://doi.org/10.2131/jts.20.135>
- Watanabe T. (1995). Effect of alkaline ionized water on reproduction in gestational and lactational rats. *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 20, no. 2, pp. 135–142.
- Watanabe T. și Shirai W. (1990) : Influence of alkaline ionized water on reproductive functions in the rat. *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 35, 748-751.
- Watanabe T. și Shirai W. (1990). Influence of alkaline ionized water on reproductive functions in the rat. *International Journal of Fertility and Sterility*, vol. 35, pp. 748–751.
- Watanabe T., Kishikawa Y. și Shirai W. (1997). Influence of alkaline ionized water on rat erythrocyte hexokinase activity and myocardium. *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 141–152.
- Watanabe T., Kishikawa Y., Shirai W. (1997). Influence of alkaline ionized water on rat erythrocyte hexokinase activity and myocardium. *J Toxicol Sci*, 22:141–52.
- Watanabe, T.; Kishikawa, Y.; Shirai, W. (1997). Influence of alkaline ionized water on rat erythrocyte hexokinase activity and myocardium. *J. Toxicol. Sci.* 22, 141–152.
- Weidman J., Holsworth R. E. Jr, Brossman B., Cho D. J., St Cyr J., Fridman G. (2016). Effect of electrolyzed high-pH alkaline water on blood viscosity in healthy adults. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 28, 13-45. <https://doi.org/10.1186/s12970-016-0153-8>
- Wells G.A., Shea B., O'Connell D., Robertson J., Peterson J., Welch V., Losos M., Tugwell P. (2000). The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp (accesat în 5 Martie 2021).
- Wolf K.J., Daft J.G., Tanner S.M., Hartmann R., Khafipour E., Lorenz R.G. (2014). Consumption of acidic water alters the gut microbiome and decreases the risk of diabetes in NOD mice. *The journal of*

- histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 62, 237–250, <https://doi.org/10.1369/0022155413519650>
- Wright J.M., Schwaetz J., Dockery D.W. (2004). The effect of disinfection by-products and mutagenic activity on birth weight and gestational duration. *Environmental Health Perspectives*, 112, 920–925.
 - Wright M.E., Michaud D.S., Pietinen P., Taylor P.R., Virtamo J., Albanes D. (2005). Estimated urine pH and bladder cancer risk in a cohort of male smokers (Finland). *Cancer Causes Control*, 16:1117–23.
 - Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D., Lewis J.D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* 334, 105–108, <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
 - Xu H., Jia T., Huang X., Riserus U., Cederholm T., Ärnlov J., Sjögren P., Lindholm B., Carrero J.J. (2014). Dietary acid load, insulin sensitivity and risk of type 2 diabetes in community-dwelling older men. *Diabetologia*, 57:1561–8.
 - Xu L., Ouyang W., Qian Y., Su C., Su J., Chen H. (2016). High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental Pollution*, 213, 119–126. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.013
 - Yan H., Kinjo T., Tian H., Hamasaki T., Teruya K., Kabayama S., Shirahata S. (2011). Mechanism of the lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* by electrolyzed reduced water—Participation of Pt nanoparticles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1295–1299.
 - Yan H., Tian H., Kinjo T., Hamasaki T., Tomimatsu K., Nakamichi N., Teruya K., Kabayama S., Shirahata S. (2015). Extension of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by the use of electrolyzed reduced water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2011–2015.
 - Yan, H.; Kinjo, T.; Tian, H.; Hamasaki, T.; Teruya, K.; Kabayama, S.; Shirahata, S. (2011). Mechanism of the lifespan extension of *Caenorhabditis Elegans* by electrolyzed reduced water—Participation of Pt nanoparticles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1295–1299.
 - Yang, E.-J.; Kim, J.-R.; Ryang, Y.-S.; Kim, D.-H.; Deung, Y.-K.; Park, S.-K.; Lee, K.-J. A (2007). clinical trial of orally administered alkaline reduced water. *Biomed. Sci. Lett.* 13, 83–89.
 - Yoon, Y.S.; Kim, D.H.; Kim, S.K.; Song, S.B.; Uh, Y.; Jin, D.; Qi, X.F.; Teng, Y.C.; Lee, K.J. (2011). The melamine excretion effect of the electrolyzed reduced water in melamine-fed mice. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1814–1819.
 - Zetterberg A., Engström M W. (1981) Mitogenic effect of alkaline pH on quiescent, serum-starved cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 4334–4338.
 - Zetterberg A., Engström M W., Larsson O. (1982) Growth activation of resting cells: induction of balanced and imbalanced growth. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 10, 130–147.
 - Zhao Y., Tarbell K.V. (2015). Comment on Sof et al. pH of Drinking Water Influences the Composition of Gut Microbiome and Type 1 Diabetes Incidence. *Diabetes* 63: 632–644. <https://doi.org/10.2337/db15-0321>
 - Zheng X.F., Sun X.J., Xia Z.F. (2011). Resuscitation, a new cytoprotective approach. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 38, 155–163.