

제2형 당뇨 모델 db/db 마우스에서 4개월의 자화수 섭취 후 혈당, 항산화 상태 및 세포 DNA 손상 개선 효과

이혜진 · 강명희[†]

한남대학교 대덕밸리캠퍼스 생명나노과학대학 식품영양학과

Four months of magnetized water supplementation improves glycemic control, antioxidant status, and cellular DNA damage in db/db mice

Lee, Hye-Jin · Kang, Myung-Hee[†]

Department of Food & Nutrition, Daedeok Valley Campus, Hannam University, 1646 Yuseongdaero, Yuseong-ku, Daejeon 34124, Korea

ABSTRACT

Purpose: Water is magnetically charged upon contact with a magnet. Although magnetic water products have been promoted since the 1930's, they have not received wide acceptance since their effectiveness is still in question; however, some have reported their therapeutic effects on the body, especially the digestive, nervous, and urinary systems. **Methods:** In this study, the effect of magnetized water on glycemic control of 14 diabetic mice (CB57BK/KsJ-db/db) in comparison with 10 control mice (CB57BK/KsJ-db/+(db/+)) was investigated. Seven diabetic control (DMC) mice and seven diabetic mice + magnetized water (DM+MW) were kept for 16 weeks, followed by intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT). Weekly blood glucose was measured from tail veins. Blood obtained from heart puncture was used for HbA1c analysis. **Results:** Blood glucose level showed a significant difference starting from the 10th week of study (496.1 ± 10.2 mg/dl in DMC vs. 437.9 ± 76.9 mg/dl in DM+MW). Blood glucose followed by IPGTT showed no significant difference between groups at 0, 30, 60, 90, and 120 min, although glucose level at 180 min was significantly reduced in DM+MW mice. Plasma insulin level in DM+MW groups was only 39.5% of that of DMC groups (5.97 ± 1.69 ng/ml in DMC vs. 2.36 ± 0.94 ng/ml in DM+MW). Levels of HbA1c were 12.4% and 9.7% in DMC and DM+MW groups, respectively. **Conclusion:** These results show the promising therapeutic effect of magnetized water in regulating blood glucose homeostasis; however, long-term supplementation or mechanistic study is necessary.

KEY WORDS: diabetic mice, magnetized water, glycemic control, HbA1c, insulin

서 론

당뇨병은 대표적인 만성질환으로 최근에 많이 발생하고 있는 추세이다.¹ 대한당뇨병학회에 따르면 우리나라의 30세 이상 당뇨병 환자는 현재 480만 명이며, 우리나라 성인의 25%가 당뇨 전 단계를 가지고 있다.¹ 또한 10명 중 3명은 본인이 환자임에도 불구하고 인지하지 못하고 있으며, 당뇨 환자의 10.8%는 여전히 치료를 받지 못하고 있다.¹ 당뇨병은 여러 가지 유형이 있으며 이 중 제 2형 당뇨병은 생활 습관으로 인해 발생하는 것으로 서구화된 식습관과 운동 부족 등이 원인이 될 수 있다.

당뇨병에 걸리면 체내 산화 스트레스 증가로 인해 reactive oxygen species 형성이 증가하며 이로 인해 세포 DNA에 손상을 일으켜 거의 모든 조직에 영향을 주어 다양한 합병증을 유발시킨다.² Streptozotocin으로 유발 시킨 당뇨 쥐의 경우 정상쥐에 비해 DNA 손상 정도가 유의적으로 높은 것이 확인되었으며,^{3,4} Mozaffari 등⁵은 노의 8-OHdG로 본 DNA 손상도가 정상쥐에 비해 제2형 당뇨쥐에서 유의적으로 높음을 보고하였다. 이처럼 당뇨병은 산화 스트레스로 인한 세포 손상을 일으키기 때문에 항산화 방어 체계를 완화 시키게 되면 동맥경화나 심혈관질환 등 합병증으로 진전될 위험을 줄일 수 있다. 이에 따라 당뇨병에 걸린

Received: November 17, 2016 / Revised: December 11, 2016 / Accepted: December 15, 2016

[†]To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-42-629-8791, e-mail: mhkang@hnu.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

환자나 동물모델을 대상으로 항산화 물질들을 투여하는 영양 중재 연구가 활발하게 진행되고 있으며 항산화제 투여로 인해 체내 항산화 상태가 호전되는 효과가 있음이 보고되고 있다.⁶⁻⁸ Shirpoor 등⁶은 streptozotocin 유발 당뇨병에 비타민 E를 보충시켰을 때 보충시키지 않은 당뇨병군(DMC)에 비해 항산화 효소인 SOD와 catalase 농도가 유의적으로 증가함을 보고하였으며, Mitri 등⁷은 당뇨병 환자에게 비타민 D를 보충하였을 때 disposition index로 본 췌장 β세포의 기능이 향상됨을 보고하였다. 제 2형 당뇨병 환자에게 아연을 보충시켰을 때, placebo군에 비해 당뇨병환자의 혈장 TBARS 농도가 유의적으로 감소하여 산화 스트레스가 개선되었음도 보고되었다.⁸

당뇨를 예방하거나 치료하기 위해 항산화 비타민 혹은 무기질 뿐 만 아니라 천연식품에서 생리활성물질을 추출하거나 천연 가공식품 등을 투여하는 연구도 활발하게 이루어지고 있다.⁹⁻¹¹ Lee 등⁹은 β-glucan 함량이 높은 유색 보리와 귀리를 이용하여 당뇨병환자용 즉석죽을 제조하여 streptozotocin 유발 당뇨병에 섭취시킨 결과 대조군에 비해 인슐린 분비 기능이 향상되었음을 보고 하였고, 생약재와 외송 추출물의 복합조성물을 streptozotocin 유발 당뇨병에 보충시킨 결과 혈당 저하 및 지질 개선 효과가 관찰되었다.¹⁰ 제 1형 당뇨병 모델쥐와 제 2형 당뇨병 모델쥐에게 녹차 추출물을 보충 시킨 결과, 당뇨병의 형태에 상관없이 혈당 증가 억제 효과가 나타났다.¹¹ 또한 녹차 추출물의 섭취가 제2형 당뇨병 또는 대사 증후군에 있어 산화 스트레스 감소 뿐 만 아니라 인슐린 민감성도 개선시키는 효과를 보였다.¹² 이 밖에도 수많은 영양중재 연구들이 당뇨병환자나 당뇨병쥐를 대상으로 수행되고 있으나 당뇨병환자나 당뇨병쥐를 대상으로 음용수 또는 음료를 이용한 영양중재 연구는 매우 제한되어 있다.

자화수는 물을 특수 제작된 연구자석에 통과시킨 것으로, 자석을 통과하는 동안 물의 흐름이 자장선 (magnetic field lines)과 수직이 되어 물 분자 구조가 우리 몸의 생체수와 같은 육각형구조로 새로이 변화된 것을 말한다.¹³ 이렇게 되면 무기질 이온이 활성화되고 생체 내 흡수가 향상되며 조직세포의 생체활성이 촉진되어 각종 만성 질환에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹³ 특히, 자화수 섭취가 당뇨병에 효과가 있음이 음용경험 및 사례보고로 알려져 있으나 과학적인 실험결과는 매우 제한되어 있다.³ 현재 알려진 자화수의 효능에 대한 연구로는 자화수의 섭취가 치석을 감소시키며,¹⁴ glutamate decarboxylase 활성을 증가시킨다는 연구¹⁵가 있으며, 그 외 중국에서 보고된 자화수의 요석증 치료효과¹⁶ 및 결석용해 효과¹⁷ 등이 있다. 최근 Hafizi 등¹⁸은 마우스에 2주일 동안 자화수를 먹였을

때 나팔관 상피세포의 길이가 증가하는 것으로 보아 동물의 생식능력과 관련된 지표들을 개선시키는 효과가 있음을 보고하였다. 또 동물실험에서 전자기장 (electromagnetic fields)은 생식 기관에서의 세포 발달 및 성장에 잠재적인 효과가 있는 것도 관찰되었다.¹⁹ 저자들의 선행연구로 실험동물의 발암물질로 자주 사용되고 있는 diethyl nitrosamine (DEN)을 사용하여 ICR mouse에게 암을 유발시킨 후 6주 이상 자화수를 투여한 결과 동물의 임파구 DNA 손상이 유의적으로 감소한 것을 관찰하였다.²⁰ 또 streptozotocin 으로 유발한 제1형 당뇨병 모델에 자화수를 8주 동안 투여한 결과, 혈당 강하 효과 및 세포 DNA 손상 감소 효과가 나타나는 것을 관찰하였다.³ 그러나 아직까지 제2형 당뇨병 모델에서 자화수의 혈당 강하효과를 본 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 제1형 당뇨병에서 자화수의 혈당 강하 효과를 본 전보³에 이어 제2형 당뇨병에서도 자화수가 혈당 강하 효과 및 DNA 손상 감소효과를 보이는지 확인해 보기 위해 제2형 당뇨병 발현 마우스 (CB57BL/KsJ-*db/db*)에게 자화수를 4달 동안 섭취시킨 후, 혈당, DNA 손상 및 항산화 영양상태가 어떻게 달라지는지 관찰하고자 수행되었다.

연구방법

실험동물의 사육 및 실험설계

자화수의 혈당 강하 및 DNA 손상 감소효과를 보기위한 실험동물로는 유전적 소인에 의해 제2형 당뇨병이 발현되는 모델인 *db/db* 마우스 (CB57BL/KsJ-*db/db*) 6주령 14마리를 당뇨병군과 자화수군으로 각 7마리씩 나누었고, 대조군으로 이형접합체 (heterozygote) 마우스 (CB57BL/KsJ-*db/+*(*db/+*)) 10마리를 사용하여 3군으로 나누어 16주 동안 사육하였다. 실험동물은 중앙실험동물 (Central Lab. Animal Inc. Korea)에서 구입하여 온도와 습도가 자동 조절되는 동물실험실에서 사육하였다. 실험동물은 한 마리씩 케이지에 넣어 사육하였으며 물과 사료를 마음껏 먹게 하여 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 자화수는 9,000~13,000 가우스의 자장을 통과한 물로서 (주)코리아크린시스템으로부터 공급받아 물 대신에 투여하였다. 실험동물의 기본 실험 식이는 AIN-93 식이를 제조하여 사용하였으며 AIN-93 실험식의 내용은 Table 1과 같다. 세 군 모두 동일한 사료를 주되, 대조군과 당뇨병군은 일반 식수를 먹게 하고 자화수 투여군은 일반식수 대신에 자화수를 먹게 하였다. 본 동물실험은 한남대 동물실험윤리위원회의 심의를 통과하였다 (승인

Table 1. Composition of experimental diet¹⁾

Ingredients	Grams/kilogram diet
Casein	200.000
Cornstarch	397.486
Dextrose	132.000
Sucrose	100.000
Cellulose	50.000
Soybean oil	70.000
t-Butylhydroquinone	0.014
Salt mix ²⁾	35.000
Vitamin mix ²⁾	10.000
L-cystine	3.000
Choline bitartrate	2.500

1) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123(11):1939-51. 1993 2) AIN-93 diet, Dyets Inc., USA

번호: HNU 2016-17).

채혈 및 간 조직 채취

대조군, 당뇨군 및 자화수 투여군으로 나누어 실험식이를 급여한 16주째에 12시간 절식시킨 후 세 군의 동물을 모두 희생시켜 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 전혈은 Comet 분석을 위해 70 µL, 당화혈색소 분석을 위해 50 µL를 각각 분주하고 나머지 혈액은 lithium-heparin 처리한 polystyrene tube에 담아 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈장 인슐린 및 혈장 TRAP 분석을 위해 혈장을 분리하였다. 적혈구는 iso-osmotic phosphate buffered saline (pH 7.4)을 첨가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리를 세 반복한 뒤 buffer와 1:1로 희석하여 erythrocyte suspension으로 만들었으며 혈장과 적혈구는 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다. 간 조직은 희생시킨 후 간을 절제하여 차가운 식염수로 세척한 다음 여과지로 물기를 제거하고 액체질소로 급속 냉동시켜 분석할 때까지 -70°C에 보관하였다.

혈당 측정 및 복강 내 당부하 검사 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)

혈당은 실험식이 급여 16주째 동물을 12시간 절식시킨 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채혈하여 혈당계 (Accutrend GC, Roche, Germany)를 이용하여 측정하였다. 복강 내 당부하 검사를 위해 공복 혈당 수준을 initial data로 한 후 incubation tube를 사용하여 50% glucose 용액 (2 g glucose/1 kg bw)을 복강 투여하고 30분, 60분, 90분, 120분 및 180분에 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당 농도 변화를 혈당

계 (Accutrend GC, Roche, Germany)로 측정하였다.

당화혈색소 (glycated hemoglobin) 측정

당화 혈색소는 Hemoglobin A1c kit (BioSystem. Ltd)를 이용하여 측정하였다. 전혈 50 µL을 potassium phthalate 용액 200 µL와 섞어 상온에 15분 동안 반응시켰다. Column을 통해 hemolysate를 phosphate buffer로 내려 준 후 UV/VIS spectrophotometer로 415 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다.

혈장 인슐린 측정

실험동물의 혈장 인슐린 수준은 전보³⁾에서와 같이 enzyme-linked immunosorbent assay에 따라 insulin ELISA kit (Linco. Ltd)를 사용하여 측정하였다. 96 plate well에 10 µL assay buffer, 10 µL matrix solution, 혈장 10 µL을 순서대로 넣어 준 80 µL detection antibody와 혼합하여 2시간 동안 상온에서 shaking하였다. Wash buffer로 3번 씻어 준 후 100 µL enzyme solution을 넣고 다시 상온에서 30분간 shaking 한 후 wash buffer로 씻어 주었다. 여기에 100 µL substrate solution을 넣은 후 15분 간 shaking 하여 590 nm의 파장에서 ELISA reader (SUNRISE)를 이용하여 absorbance를 측정하였다.

혈장 TRAP 수준 분석

혈장 중 TRAP 수준은 ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazole-6-sulfonate), (150 µM)와 metmyoglobin (2.5 µM)을 H₂O₂ (75 µM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample (0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30°C에서 배양한 후 UV/VIS spectrophotometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 수준은 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

적혈구 항산화 효소 활성 측정

적혈구 SOD (superoxide dismutase) 활성도를 측정하기 위해 적혈구 현탁액을 증류수로 용해시킨 후 ethanol과 chloroform을 가하고 이를 3,000U/min에서 2분간 원심 분리하였다. 그 상층액을 여러 농도로 나누어 37°C에서 10분간 배양 후 20 µL의 pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol)를 첨가하여 그 농도를 UV/VIS spectrophotometer로 320

nm에서 180초간 측정하였다. 적혈구 내 SOD의 활성은 pyrogallol의 자동산화율 50% 억제하는 항산화능으로 정의하였다.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) 측정을 위해 용혈시킨 적혈구에 glutathione, glutathione reductase, NADPH를 첨가한 후 37°C에서 10분간 배양한 후에 T-butylhydroperoxide를 넣어 반응시켰으며 이때 감소된 NADPH의 농도를 UV/VIS spectrophotometer로 340nm에서 90초 동안 측정함으로써 GSH-Px의 항산화 정도를 측정하였다.

Comet assay에 의한 임파구 DNA 손상 측정

임파구 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay는 선행연구³에서와 같이 Singh의 방법²¹을 수정 보완하여 실시하였다. 신선한 전혈 70 µL을 채취하여 low melting agarose gel (LMA)과 normal melting agarose (NMA)를 이용하여 슬라이드를 만들었다. Gel이 굳으면 LMA 용액 75 µL로 한 겹 더 덮은 후 cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 슬라이드를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지 시키어 DNA의 이중 나선 구조를 풀어주었다. Lysis가 끝난 슬라이드를 전기영동 tank에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH > 13)를 채워 unwinding 시킨 후 25 V/300 ± 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Tris 완충용액 (pH 7.4)으로 충분히 세척하고 건조시킨 후 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경 (Leica, Germany)상에서 관찰하고 CCD 카메라 (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상 및 자화수 섭취에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리인 tail length (TL), % DNA in tail (% DNA), 그리고 TL과 % DNA를 곱해준 값인 tail moment (TM) 등 3가지 분석 지표로 살펴보았으며, 각 대상자 당 2개의 슬라이드를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상 정도를 측정하였다.

Comet assay에 의한 간 DNA 손상 측정

실험동물의 간 조직을 일정량 취하여 10배에 해당하는 HBSS buffer (1 mg/g collagenase)를 섞고 shaking incubator (120 rpm, 37°C)에 넣어 세포를 분리한 후 low melting agarose gel과 섞어 슬라이드에 분산시키며 이후 혈액 comet 방법과 동일한 과정으로 분석하였다.

자료의 처리

모든 자료는 SPSS-PC+ 통계 package (version 18.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 ± 표준오차 (SE)를 구하였고 각 군별로 유의성 검증을 위해서 일원분산분석 (ANOVA)를 실시한 후 사후검증 방법으로는 Duncan's Multiple Range Test를 통해 각 군 간의 평균 차이에 대한 유의성을 검증하였다. 모든 통계적 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결 과

실험동물의 체중변화, 식이섭취량 및 수분 섭취량을 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 대조군 (CON)에 비해 당뇨병군 (DMC)과 자화수 투여군 (DM+MW)의 체중변화와 식이섭취량에는 차이가 없었으나, 수분섭취의 경우 혈당이 떨어지는 시점에 맞추어 대조군에 비해 당뇨병군이 높았으나, 자화수 투여군에서는 당뇨병군에 비해 유의적으로 낮아짐을 보였다.

실험이 진행되는 16주 동안 세 군의 혈당 변화를 살펴본 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군은 실험 기간인 16주 동안 혈당의 변화가 거의 없었으며, 당뇨병군의 경우에는 높은 혈당을 유지하였다. 자화수를 투여하였을 경우, 투여 10주부터 당뇨병군 (496.1 ± 10.2 mg/dL)에 비해 자화수 투여군 (437.9 ± 76.9 mg/dL)의 혈당이 유의적으로 감소하였으며, 이러한 감소효과는 실험이 끝나는 주인 16주까지 지속되었으며 감소효과는 시간이 경과할수록 더 크게 나타났다 (Fig. 1).

자화수가 당뇨병의 내당능에 미치는 영향을 알아보기 위해 포도당을 동물에게 복강 투여한 후 시간별로 혈액을 채취하여 당부하 검사를 수행한 결과 혈당 곡선하면적 (area under the curve, AUC)은 Fig. 2에 나타났다. 대조군에서 포도당 투여 30분 후에 혈당이 증가하였고 60분 후에는 감소하기 시작하여 90분, 120분, 180분에도 감소한 수준을 유지하는 패턴을 보인데 비해 당뇨병군에서는 포도당 투여 30분 후에 증가한 혈당이 포도당 투여 180분 후까지 감

Table 2. Body weight gain, food intake and water intake of mice

Groups	Initial BW (g)	Final BW (g)	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)
CON	19.58 ± 0.24 ^a	40.24 ± 3.20 ^a	20.66 ± 3.18	10.55 ± 0.24 ^a
DMC	32.16 ± 1.34 ^b	54.68 ± 6.95 ^b	22.52 ± 7.60	62.95 ± 11.90 ^c
DM+MW	31.86 ± 1.28 ^b	55.46 ± 7.50 ^b	23.60 ± 8.10	30.04 ± 3.10 ^b

Mean ± SD

Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7)

Significantly different from control group (p < 0.05) by Duncan's test.

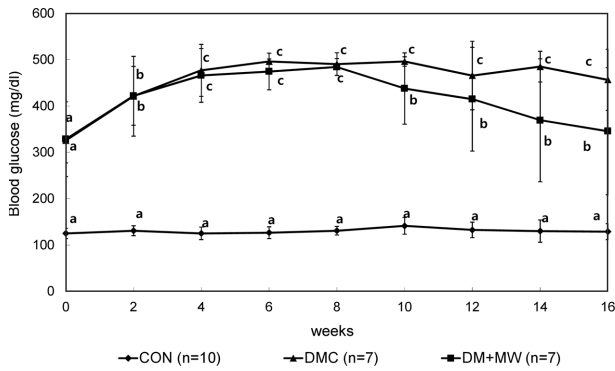


Fig. 1. Effect of magnetized water on blood glucose in *db/db* mice. Mean \pm SD. Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7). Values within a group with different alphabet are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

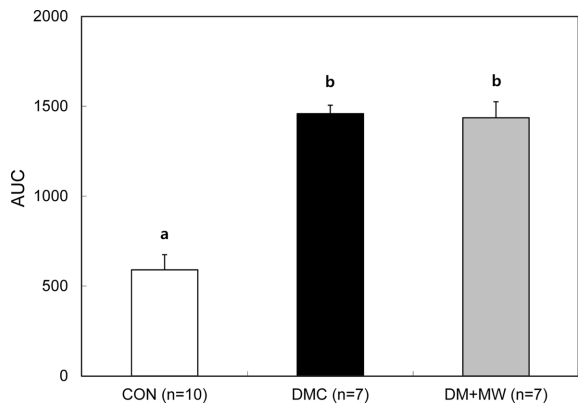


Fig. 2. Effect of magnetized water on area under the blood glucose curve after oral glucose tolerance test in *db/db* mice. Mean \pm SD. Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7); AUC, area under the curve. Values with different alphabet are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

소하지 않고 지속되었다. 이에 비해 자화수 투여군은 포도당 투여 30분 후에 증가한 혈당이 60분에 최고를 보인 후, 120분부터 조금씩 감소하는 경향을 보이다가 180분 후에 유의적으로 감소하였다. 그러나 혈당 곡선하면적 (area under the curve, AUC)은 당뇨군과 자화수 투여군에서 약간의 차이는 보였으나 유의적으로 나타나지 않았다.

본 연구에서 당뇨군과 자화수 투여군의 혈장 인슐린 수준을 비교해 본 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군 (3.94 ± 2.67 ng/ml)에 비해 당뇨군 (5.97 ± 1.69 ng/ml)의 혈장 인슐린 수준이 높은 경향을 보였으며, 당뇨군에 비해 자화수 투여군 (2.36 ± 0.93 ng/ml)에서 유의적인 감소하는 것으로 나타났다.

장기간의 혈당 수준을 나타내는 지표인 혈액 당화헤모글로빈 함량을 비교해 본 결과, 5.8%를 보인 대조군에 비

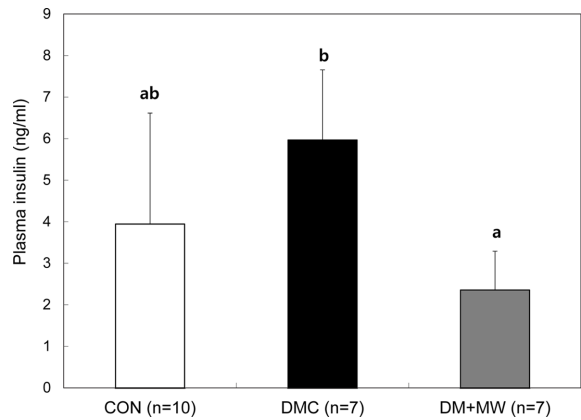


Fig. 3. Effect of magnetized water on plasma insulin in *db/db* mice. Mean \pm SD. Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7). Bar with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

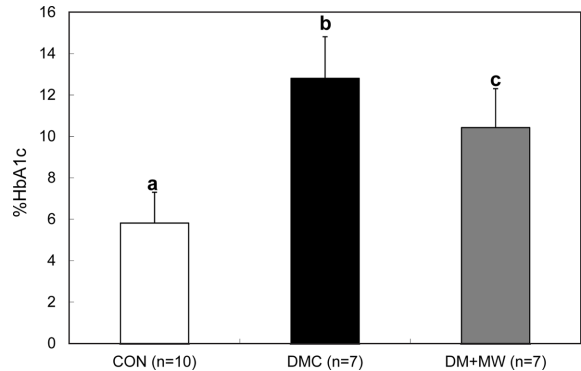


Fig. 4. Effect of magnetized water on blood HbA1c in *db/db* mice. Mean \pm SD. Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7). Bar with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

해 당뇨군의 경우 12.8%로 약 2.2배 증가하였으나 자화수 투여군에서는 10.4%로 당뇨군에 비해 유의적으로 감소하여 자화수투여가 당뇨군의 당화헤모글로빈 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

당뇨군의 혈액 임파구 DNA 손상 정도를 comet assay로 본 결과는 Fig. 5에 제시하였다. DNA 손상의 세 가지 지표인 DNA in tail, tail length, tail moment로 보았을 때 대조군에 비해 당뇨군의 DNA 손상이 유의적으로 높았으며 자화수 투여군에서는 DNA in tail에서 46.7%, tail length로 보았을 때 24.0%, 그리고 tail moment로 보았을 때 60.1%가 감소함을 보였다. 이로써 16주간의 자화수 섭취 시 *db/db* mouse에서 높아진 혈액 임파구 DNA 손상이 자화수 투여로 인해 효과적으로 낮아짐을 알 수 있었다 (Fig. 5).

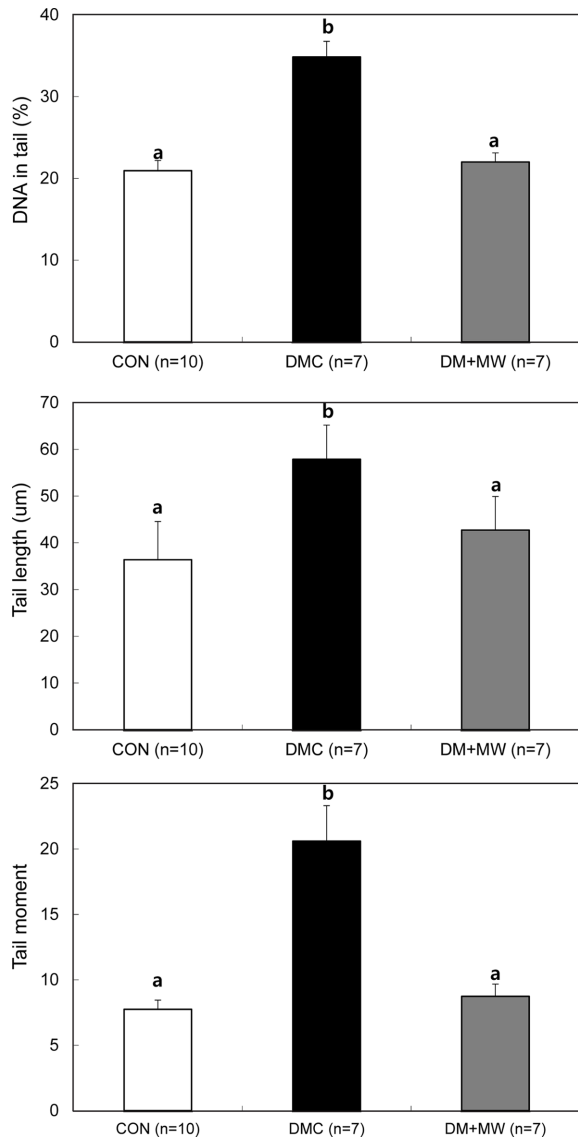


Fig. 5. Protective effect of magnetized water on blood DNA damages in *db/db* mice. Mean \pm SD. Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7). Bar with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

동물의 간에서 DNA 손상 정도를 본 결과도 혈액 DNA 손상 정도와 같은 경향을 보였다. DNA 손상 정도를 DNA in tail, tail length, tail moment의 3가지 지표로 보았을 때, 제2형 당뇨병쥐인 *db/db* mouse에서 높아진 DNA 손상 정도가 자화수 투여로 인해 48%, 26%, 61% 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

당뇨쥐에 있어서 자화수의 항산화효과를 관찰하기 위해 적혈구 항산화 효소인 GSH-Px와 SOD의 활성을 살펴보았다. 모든 군 간에 적혈구 내 항산화 효소활성도에는 차이를 보이지 않았다 (Table 3). 또 당뇨 쥐 혈장 내 총항산화능

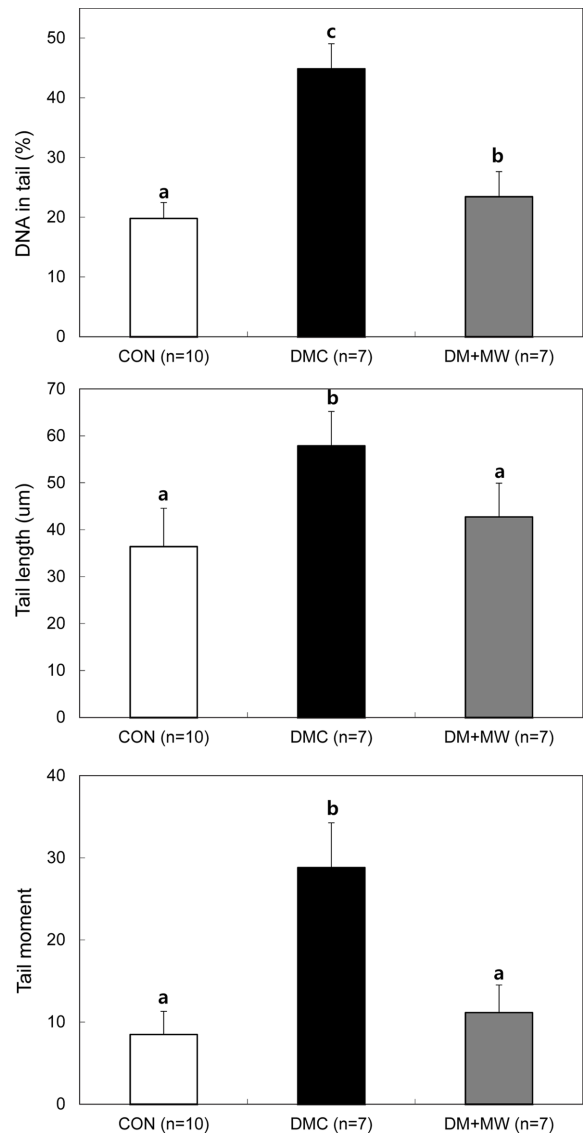


Fig. 6. Protective effect of magnetized water on liver DNA damages in *db/db* mice. Mean \pm SD. Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7). Bar with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of magnetized water on plasma TRAP and erythrocyte antioxidant enzymes in *db/db* mice

Variable	TRAP (uM)	GSH-Px (U/gHb)	SOD (U/gHb)
CON	1.41 \pm 0.14	97 \pm 33	2491 \pm 425
DMC	1.24 \pm 0.14	95 \pm 44	2314 \pm 248
DM+MW	1.35 \pm 0.19	102 \pm 16	2380 \pm 398

Mean \pm SD

Abbreviations: CON, control (n = 10); DMC, diabetes mellitus control (n = 7); DM+MW, DM+Magnetic water (n = 7)

(TRAP)을 살펴본 결과, 당뇨군과 자화수 투여군과의 유의적인 차이는 보이지 않았다 (Table 3).

고 찰

제 2형 당뇨병은 인슐린 저항성으로 인해 인슐린 요구량이 상대적으로 증가하다가 결국 인슐린 분비 기능에 결함이 생겨 인슐린이 더 이상 분비 되지 않아 발병한다. 제 2형 당뇨병의 예방과 치료에 식물을 사용하는 연구들이 많이 보고되고 있으며, 특히 동물에서 혈당강하 및 산화스트레스 감소 등에 대한 연구들^{11,12}과 함께 인체연구로도 여러 방면에서 연구들이 발표되고 있다.^{22,23} 그러나 식품이 아닌 음료를 이용하여 혈당 강하 효과를 본 인체 대상 연구는 극히 제한되어 있다.

본 연구에서 제2형 당뇨 모델 동물에게 16주 동안 자화수를 투여한 결과, 당뇨대조군에 비해 자화수 투여군의 혈당강하 효과가 뚜렷하게 나타났으며 혈장 인슐린 및 당화혈색소 지표에서도 자화수 투여의 효과가 뚜렷하게 나타났다. 또한 자화수군의 수분섭취량도 혈당이 강하되는 9주~10주 사이부터 당뇨군에 비해 감소하였는데 이러한 효과는 아마도 혈당이 개선되면서 당뇨로 인해 증가하였던 수분 섭취가 감소하였기 때문인 것으로 보인다. 본 연구실의 선행연구에서 자화수의 투여가 streptozotocin으로 유발한 제1형 당뇨쥐에서 혈당강하 효과가 있는 것이 확인된 것에 이어,³ 이번에 제2형 당뇨 모델을 사용한 본 연구에서도 역시 자화수를 16주 투여하였을 때, 혈당 강하 등 glycemic control이 개선되는 효과가 나타났다. 당뇨 환자에 있어 혈당 조절은 가장 기본적이며 매우 중요한 의미를 갖는다. 또한 제2형 당뇨의 경우 인슐린 저항성은 인슐린 분비를 조직에서 알아차리지 못하여 제대로 작용하지 못하게 되고 이는 다양한 합병증을 유발하기도 한다. 자화수의 투여가 혈장 인슐린 농도를 당뇨군에 비해 유의적으로 감소시키고 혈당 강하가 일어난 것으로 보아 인슐린 저항성이 개선된 것으로 생각된다.

당화혈색소는 공복혈당 지표보다 더 안정적인 당뇨 관련 지표로 장기간의 혈당을 반영한다. 당화헤모글로빈이 증가하게 되면 적혈구의 산소 분해 능력이 저하되고 조직으로의 산소 이동도 저하된다. 이로 인해 합병증이 유발되며 이는 당뇨병에 있어 매우 중요한 의미를 갖는 지표로 사용된다. 본 연구에서 일정 기간 동안의 자화수 투여가 제2형 당뇨모델 동물의 당화 헤모글로빈을 유의적으로 감소시킨 것으로 보아 장기간의 자화수음용은 당화혈색소 농도를 감소시켜 혈당 조절에 효과적인 역할을 하는 것으로 보인다.

자화수는 일반 물에 비해 pH와 전기 전도율이 높고,²⁴ 삼투압도 높아 세포막을 통한 침투성이 강하며,²⁵ 세포 내에 직접적인 영향을 주어 세포 내 효소들을 활성화시키기도

한다.²⁶ Kim 등²⁷은 *db/db* mouse에게 일정기간 동안 이온수 (electrolyzed reduced water)를 보충 투여한 결과 혈당 개선 효과를 보였는데 이는 이온수의 섭취가 동물 체장의 β -세포 손상을 보호함으로써 나타난 결과라고 하였다. 이온수는 pH가 높고 ROS 소거능이 뛰어난 것으로 알려져 있는데,²⁷ 자화수의 경우에도 일반 물에 비해 높은 pH를 가지고 있고, 실험동물에서 DNA 손상을 감소시키는 효과도 있으므로^{3,20} 이온수의 투여와 비슷한 결과들이 나타난 것으로 보인다.

당뇨로 인해 임파구 DNA 손상이 일어날 수 있음은 많이 알려져 있다.^{28,29} Lazalde-Ramos 등²⁸은 제 2형 당뇨 환자를 대상으로 한 연구에서 뇨의 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 본 DNA 손상정도가 대조군에 비해 높음을 보고하였으며, Lodovici 등²⁹도 마찬가지로 제 2형 당뇨 환자가 대조군에 비해 임파구 DNA 손상도가 높음을 comet assay를 통해 확인하였다. 또한 비인슐린 의존성 환자를 대상으로 한 연구들에서 산화 스트레스가 증가함에 따라 항산화 체계가 저하되는 것이 보고되었다.^{22,23}

본 연구에서 당뇨로 인해 손상된 *db/db* mouse의 세포 DNA 손상이 자화수 투여로 회복되는지를 comet assay로 알아본 결과, 혈액과 간 모두 DNA 손상의 세 가지 지표로 본 DNA 손상이 자화수 투여 후에 유의적으로 감소되는 효과가 나타났다. 본 연구실에서 수행한 선행연구에서 발암물질의 일종인 diethyl nitrosamine (DEN)을 투여한 ICR mouse에게 일정기간 동안 자화수를 투여하였을 때 DNA 손상 정도가 유의적으로 감소하였고,²⁰ streptozotocin으로 유발한 제1형 당뇨쥐 모델에 자화수를 8주 동안 투여하였을 때 임파구의 DNA 손상 감소효과가 나타났다.³ 제2형 당뇨 모델인 *db/db* mouse를 사용한 본 연구에서도 역시 16주 동안의 자화수 투여 후에 세포의 DNA 손상 감소효과가 확연히 나타났다. 이로써 장기간의 자화수 투여는 제1형 뿐 아니라 제2형 당뇨에 있어서도 glycemic control 뿐 아니라 당뇨로 인해 혹은 다른 원인으로 인해 손상된 혈액과 간 세포의 DNA를 회복시키는 효과도 있는 것으로 보인다.

인체와 동물에 있어서 동맥경화증 예방과 치료에 대한 자화수의 효과가 최근 연구되었으며, 그의 기전에 대해 여러 가지 일치하지 않는 가정들이 제안되고 있다.^{15,30,31} 암컷 마우스의 생식기관에 미치는 자화수의 영향에 대한 연구결과가 보고되었으며,¹⁸ 자화수 투여는 나팔관 (fallopian)의 길이와 corpus lutea의 수를 증가시키는 효과가 있었다. 이런 효과의 기전은 불분명하나 가능한 가설로는 자화수의 이런 효과가 산화 스트레스와 상피세포에서의 세포 성장과 관련이 있을 수 있음이 제시되었다.¹⁸

그 동안 자화수와 일반 물과의 여러 가지 차이에 대한 연구들도 수행되었는데,³² 자화수는 산소 농도와 무기질 용해도를 증가시키고, 표면 장력 뿐만 아니라 전기 전도도를 감소시킴으로써 세포벽의 투과성 (침투성)이 향상되어 물과 영양소를 신체의 모든 조직으로 잘 전달되도록 촉진시킴으로써 세포가 효율적으로 성장하도록 도울 수 있다.^{33,34} Nakagawa 등³⁴은 자기장 (magnetic field)이 있을 때 물에 대한 산소의 용해도가 가속되는 것을 관찰하였다. 또 자화수는 세포 내에서 여러 효소들을 활성화시킴으로써 생화학적 반응들을 증가시키는 것으로 보인다.¹⁸ Ma 등¹⁵은 potentiometric enzyme electrode법으로 효소활성도를 측정 한 결과 자화수로 인해 glutamate decarboxylase 활성이 약 30% 증가한 것을 관찰하여 자화수의 생리활성에 대한 기전을 glutamate decarboxylase 효소의 활성 증가로 인한 것이라 제안하였다. 이런 효소활성도의 증가는 자화수가 약한 자장을 형성하면 자화수 분자들 간의 상호작용은 감소하는 반면 자화수와 효소가 상호작용을 일으켜 효소의 활성도를 변화시키기 때문이다. 자화수가 작은 분자들, 특히 Ca^{2+} 와 같은 작은 분자의 세포막 투과성을 증가시키거나 간에서 superoxide dismutase (SOD) activity를 증가시킬 수 있음도 보고되었다.¹⁸ 몇몇 동물실험에서 자화수 투여는 심장, 신장, 그리고 간에서 superoxide dismutase 활성을 증가시키고, oxidant-antioxidant 균형에 효율적으로 영향을 주어 malondialdehyde (MDA) 양을 감소시키며, 산화 스트레스를 감소시키는 nitric oxide의 양을 감소시킴이 관찰되었다.³⁶ 또 자화수 투여로 암컷 쥐의 생식작용이 향상되었는데, 이는 자화수가 free radicals와 산화 스트레스를 감소시키는 것과 관련이 있음도 제시되었다.³⁷ 따라서 본 연구에서 자화수 섭취로 인한 DNA 손상 감소 효과는 동물의 산화 스트레스 감소에 따른 것으로 여겨진다. 자화수 투여로 DNA 손상이 감소되는 효과가 항산화 효소 활성화와 관련이 있을 것으로 생각되었으나 본 연구에서 항산화 효소인 적혈구 SOD와 glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성이 자화수 섭취 후 유의적으로 개선되지 않았으므로 DNA 손상 감소효과와 효소 활성도와와의 관련성에 대한 부분은 앞으로 더 깊이 있게 연구가 되어야 할 것이다. 실제로 체내 존재하는 수많은 효소들은 대사에 있어 서로 영향을 미치기 때문에 어느 효소의 작용에 의한 것인지 그 기전을 명확하게 알아보는 것은 쉽지 않으며 본 연구에서 항산화 효소 외에 다른 효소들의 활성을 분석하지 않아 DNA 손상 감소효과의 정확한 기전은 규명하기 어려웠다.

본 연구에서 자화수 섭취시킨 당뇨병을 대상으로 DNA 손상도를 측정하였고 몇 가지 항산화 효소 활성도를 측정 하기는 하였으나 당뇨에 있어서 혈당저하의 작용기전을

뒷받침할 실험적인 관찰이나 nitric oxide 등 더 다양한 산화 스트레스 지표를 측정하지 못한 점은 본 연구의 제한점이라고 할 수 있다. 앞으로 당뇨의 혈당강하 기전과 관련된 좀 더 다양한 산화 스트레스 관련 지표들을 광범위하게 측정하는 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것이다.

이상으로 자화수 투여가 *db/db mouse*를 사용한 제2형 당뇨의 혈당 강하를 포함한 glyceimic control에 유리한 개선 효과를 보일 뿐 아니라 혈액과 간의 DNA 손상 감소효과 까지 보임을 확인하였다. 그 동안의 이러한 여러 연구에도 불구하고, 자화수의 의료분야에의 응용은 아직도 결론을 내기 어려운 상황이다.^{38,39} 그러나 그 기전에 대해서는 확실하게 규명하지 못하였으므로 앞으로 자화수응용 효과를 뒷받침할 더욱 깊고 다양한 기전 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

자화수는 가격이 비싸지 않고 쉽게 만들 수 있으며 환경 친화적인 음용수임에도 불구하고 자화수 섭취의 건강상의 유익에 관해서는 과학적인 문헌이 매우 제한적이다. 본 연구는 유전적 소인에 의해 제2형 당뇨병이 발현되는 모델인 *db/db* 마우스 6주령 14마리를 당뇨병군과 자화수군으로 나누어 각 7마리씩 배치하고, 이형접합체 마우스 10마리를 대조군으로 하여 총 3군으로 나누어 16주 동안 자화수를 투여하였다. 혈당 강하 효과를 보기 위해 공복혈당, 인슐린 농도, 내당능 검사, 당화 헤모글로빈을 측정 하였고, DNA 손상 감소 효과, 항산화 상태를 알아보았다. 당뇨병군과 자화수군의 혈당치는 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 당뇨병군의 혈당은 자화수 섭취 16주까지 높게 지속되었으나 자화수군의 혈당은 섭취 10주 후부터 유의적으로 감소하였다. 혈중 당화헤모글로빈 함량도 마찬가지로 대조군보다 당뇨병군에서 증가하였고 자화수군에서는 유의적으로 감소하였으나 경구 당부하 검사 결과, 혈당 곡선하면적 (area under the curve, AUC)은 당뇨병군과 자화수 투여군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 당뇨병의 DNA 손상 정도는 세 가지 지표 (DNA in tail, tail length, tail moment) 모두 자화수군이 당뇨병군에 비해 유의적으로 감소하였으며 이러한 효과는 혈액과 간에서 모두 나타났다. 적혈구 항산화 효소인 SOD, GSH-Px glutathione peroxidase 활성도는 대조군, 당뇨병군, 자화수군 간에 차이를 보이지 않았고, 혈장 총항산화능인 TRAP 수준도 자화수 섭취로 인한 차이를 볼 수 없었다. 결론적으로 자화수 투여가 *db/db mouse*를 사용한 제2형 당뇨의 혈당 강하를 포함한 glyceimic control에 유리한 개선효과를 보일 뿐 아니라 혈액과 간의 DNA

손상 감소효과까지 보임을 확인하였다. 그러나 그 기전에 대해서는 확실하게 규명하지 못하였으므로 앞으로 자화수용 효과를 뒷받침할 더욱 깊고 다양한 기전 연구가 수행되어야 할 것이다.

References

1. Korean Diabetes Association; Korean Diabetes Research Foundation. Diabetes fact sheet in Korea 2016. Seoul: Korean Diabetes Association; 2016.
2. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347(8999): 444-445.
3. Lee HJ, Kang MH. Effect of the magnetized water supplementation on blood glucose, lymphocyte DNA damage, antioxidant status, and lipid profiles in STZ-induced rats. *Nutr Res Pract* 2013; 7(1): 34-42.
4. Park JH, Sung KS, Kim SS, Shim GS, Han CK. Effects of puffed and fermented red ginseng on blood glucose-related biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012; 41(5): 630-637.
5. Mozaffari MS, Baban B, Abdelsayed R, Liu JY, Wimborne H, Rodriguez N, Abebe W. Renal and glycemic effects of high-dose chromium picolinate in db/db mice: assessment of DNA damage. *J Nutr Biochem* 2012; 23(8): 977-985.
6. Shirpoor A, Ansari MH, Salami S, Pakdel FG, Rasmi Y. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *World J Gastroenterol* 2007; 13(32): 4340-4344.
7. Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, Pittas AG. Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic β cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the calcium and vitamin D for diabetes mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(2): 486-494.
8. Roussel AM, Kerkeni A, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Anderson RA. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(4): 316-321.
9. Lee CH, Kim J, Kwon J, Youn Y, Kim YS. Instant gruel from colored barley and oats for improving diabetic conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013; 42(6): 885-891.
10. Lee SJ, Shin JH, Ju JC, Kang SK, Sung NJ. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of orostachys japonicus with medicinal herbs in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2013; 42(4): 587-594.
11. Lee BR, Koh KO, Park PS. Antihyperglycemic effects of green tea extract on alloxan-induced diabetic and OLETF rats. *Korean Soc Food Sci Nutr* 2007; 36(6): 696-702.
12. Hininger-Favier I, Benaraba R, Coves S, Anderson RA, Roussel AM. Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *J Am Coll Nutr* 2009; 28(4): 355-361.
13. Coey JM, Cass S. Magnetic water treatment. *J Magn Magn Mater* 2000; 209: 71-74.
14. Johnson KE, Sanders JJ, Gellin RG, Palesch YY. The effectiveness of a magnetized water oral irrigator (Hydro Floss) on plaque, calculus and gingival health. *J Clin Periodontol* 1998; 25(4): 316-321.
15. Ma YL, Ren H, Ren S, Zhen EK, Hao G, Zhao YW. A study of the effect of magnetized water on enzyme activities by potentiometric enzyme electrode method. *J Tongji Med Univ* 1992; 12(4): 193-196.
16. Zhang YS, Wu HW. Effect of magnetic water on urinary calculi--an experimental and clinical study. *Z Urol Nephrol* 1987; 80(9): 517-523.
17. Zhang YS, Wu HW. Effect of magnetized water on urinary calculi: an experimental and clinical study. *Acta Acad Med Wuhan* 1984; 4(1): 31-37.
18. Hafizi L, Gholizadeh M, Karimi M, Hosseini G, Mostafavi-Toroghi H, Haddadi M, Rezaiean A, Ebrahimi M, Emami Meibodi N. Effects of magnetized water on ovary, pre-implantation stage endometrial and fallopian tube epithelial cells in mice. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(4): 243-248.
19. Iorio R, Delle Monache S, Bennato F, Di Bartolomeo C, Scrimaglio R, Cinque B, Colonna RC. Involvement of mitochondrial activity in mediating ELF-EMF stimulatory effect on human sperm motility. *Bioelectromagnetics* 2011; 32(1): 15-27.
20. Lee HJ, Jo HR, Jeon EJ, Kang MH. Effect of the Magnetized water supplementation on lymphocyte DNA damage in mice treated with diethylnitrosamine. *Korean J Nutr* 2010; 43(6): 570-577.
21. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 184-191.
22. Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res* 2003; 529(1-2): 129-133.
23. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, Ilkova H. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat Res* 2002; 505(1-2): 75-81.
24. Xu YB, Sun SY. Effect of stable weak magnetic field on Cr(VI) bio-removal in anaerobic SBR system. *Biodegradation* 2008; 19(3): 455-462.
25. Gonet B. Influence of constant magnetic fields on certain physicochemical properties of water. *Bioelectromagnetics* 1985; 6(2): 169-175.
26. Liboff AR, Cherng S, Jenrow KA, Bull A. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity is altered by 20 microT magnetostatic fields. *Bioelectromagnetics* 2003; 24(1): 32-38.
27. Kim MJ, Jung KH, Uhm YK, Leem KH, Kim HK. Preservative effect of electrolyzed reduced water on pancreatic beta-cell mass in diabetic db/db mice. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(2): 234-236.
28. Lazalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macias M, Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2012; 43(6): 476-481.
29. Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res* 2008; 638(1-2): 98-102.
30. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10(1): 49-79.

31. Naher ZU, Ali M, Biswas SK, Mollah FH, Fatima P, Hossain MM, Arslan MI. Effect of oxidative stress in male infertility. *Mymensingh Med J* 2013; 22(1): 136-142.
32. Sueda M, Katsuki A, Nonomura M, Kobayashi R, Tanimoto Y. Effects of high magnetic field on water surface phenomena. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2007; 111(39): 14389-14393.
33. Cho YI, Lee SH. Reduction in the surface tension of water due to physical water treatment for fouling control in heat exchangers. *Int Commun Heat Mass Transf* 2005; 32(1-2): 1-9.
34. Nakagawa J, Hirota N, Kitazawa K, Shoda M. Magnetic field enhancement of water vaporization. *J Appl Phys* 1999; 86(5): 2923-2925.
35. Wang D, Cheng X, Yan X. Effect of magnetized liquor on free radical metabolism in the heart of mice. *Chin J Med Phys* 2002; 19(4): 243-244.
36. Raymond-Whish S, Mayer LP, O'Neal T, Martinez A, Sellers MA, Christian PJ, Marion SL, Begay C, Propper CR, Hoyer PB, Dyer CA. Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environ Health Perspect* 2007; 115(12): 1711-1716.
37. Shah D, Nagarajan N. Luteal insufficiency in first trimester. *Indian J Endocrinol Metab* 2013; 17(1): 44-49.
38. Lu J, Mao Y, Yang Y, Wang Y, Shi Y, Zhou O. Influence of magnetized water on the experimental hyperlipemia and atherosclerosis in rabbits. *Shanghai Lab Anim Sci* 2000; 20: 45-51.
39. Hafizi L, Sazgarnia A, Mousavifar N, Karimi M, Ghorbani S, Kazemi MR, Emami Meibodi N, Hosseini G, Mostafavi Toroghi H. The effect of extremely low frequency pulsed electromagnetic field on in vitro fertilization success rate in NMRI mice. *Cell J* 2014; 15(4): 310-315.