

## ÖZGÜN ARAŞTIRMA

# Döteryumu Azaltılmış Suyun Sağlıklı Gönüllülerin Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları Üzerine Etkisinin İn Vitro Saptanması

## *Determination of the in Vitro Effect of Deuterium Depleted Water on Polymorphonuclear Leukocyte Functions in Healthy Young Volunteers*

Ümran Soyoğul Gürer<sup>1</sup>, Koray Derici<sup>1</sup>, Burçak Gürbüz<sup>1</sup>, Pervin Rayaman<sup>1</sup>, Adile Çevikbaş<sup>1</sup>, Turay Yardımcı<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa/İstanbul.

<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Haydarpaşa/İstanbul.

### ÖZET

**Amaç:** Doğal sulara 150 ppm (bir milyonda bulunan kısım) döteryum (hidrojen izotopu) bulunur ki; bu çoğu sağlıklı insan için uygun miktardır. Döteryumu azaltılmış su ise sağlıklı kan hücrelerini etkilemezken vücuttaki hastalıklı hücreleri etkileyebilir. Günümüzde yaygın kullanılan antineoplastik, analjezik, antibiyotik gibi bir dizi ilaç polimorf nüveli lökosit fonksiyonlarını, bakterilerin makrofajlar tarafından fagositozunu, lenfosit proliferasyonunu ve çeşitli sitokinlerin üretimini modifiye edebilmektedir. Bu çalışmanın amacı; sağlıklı gönüllülerden elde edilen polimorf nüveli lökositlerin fagositoz ve hücre içi öldürme aktivitesi üzerine döteryumu azaltılmış suyun (29 ppm) etkisini saptamaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada 10 sağlıklı gönüllünün polimorf nüveli lökositleri venöz kandan Ficoll-hypaque gradient santrifüj yöntemi ile toplanmış ve döteryumu azaltılmış suyun, polimorf nüveli lökosit fonksiyonlarından fagositoz ve hücre içi öldürme aktivitesine etkisine modifiye Alexander yöntemi ile bakılmıştır.

**Bulgular ve sonuç:** Sağlıklı gönüllülerin döteryumu azaltılmış su ile işlem gören ve işlem görmeyen polimorf nüveli lökositleri karşılaştırıldığında, döteryumu azaltılmış suyun polimorf nüveli lökositlerin fagositoz ve hücre içi öldürme aktivitesini anlamlı olarak değiştirmedeği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Döteryumu azaltılmış su, polimorf nüveli lökosit fonksiyonları, fagositoz

### SUMMARY

**Objective:** Natural water contains 150 ppm (parts per million) of deuterium (an isotope of hydrogen), which is within the acceptable limits for most healthy people. Lowered deuterium content can affect the diseased cells in the body while having no effect on healthy blood cells. Today it is known that frequently used antineoplastic agents, analgesics and antibiotics affect the immune system cells and can modify polymorphonuclear leukocyte functions such as phagocytosis, lymphocyte proliferation and production of various cytokines. The aim of this study was to determine the effect of deuterium depleted water (29 ppm) on phagocytosis and intracellular killing activity of polymorphonuclear leukocytes in healthy young volunteers.

**Materials and Methods:** 10 healthy young volunteers were included in the study. Ficoll-hypaque gradient centrifugation was used to isolate polymorphonuclear leukocytes from venous blood. Phagocytosis and intracellular killing activity of polymorphonuclear leukocytes were assayed using a modification of Alexander's method.

**Results and conclusion:** When the effect of deuterium depleted water on polymorphonuclear leukocytes were evaluated, it was found that depletion of deuterium didn't significantly affect the polymorphonuclear leukocyte phagocytic and intracellular killing activities.

**Key Words:** Deuterium depleted water, polymorphonuclear leukocytes functions, phagocytosis

## **GİRİŞ**

Sağlıklı insan plazması yaklaşık 149-150 ppm (bir milyonda bulunan kısım) döteryum içermekte ve plazmadaki miktarı kanserli hastalarda değişiklik göstermektedir. Kanserli hastalarda plazma miktarının sağlıklı insan ile karşılaştırıldığında yaklaşık 5-7 ppm azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tümör hücreleri normal hücrelerden daha hızlı çoğalma özelliğine sahip olduklarından daha büyük miktarlarda döteryum tüketmektedirler. Farelerin içme suyu, 29 ppm musluk suyu ile değiştirildiğinde tümör hücrelerinin çoğalma hızının azaldığı; tersine döteryum konsantrasyonundaki hafif artışın ise bu çoğalmayı uyardığı saptanmıştır. Araştırmalar insan, hayvan ve bitkilerde normal hücre çoğalmasının devamı için döteryumun gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Vücut sıvılarındaki döteryum dengesi 10 günde %95'e erişir. Karaciğer, böbrek ve dalaktaki döteryum ise 3. haftada dengeye ulaşır. Benzer şekilde, plazma ya da idrar gibi insan sıvılarındaki döteryum değişiklikleri içme suyu ya da diyet içindeki döteryum miktarına bağlıdır (1). Genellikle doğal sularda insan sağlığı için uygun kabul edilen 150 ppm döteryum bulunduğu ve döteryumu azaltılmış suyun (DDW=29 ppm) ise sağlıklı kan hücrelerine etki etmeden vücuttaki hastalıklı hücreleri etkilediği gösterilmiştir (2,3).

Bugün sıklıkla kullanılan antineoplastik, analjezik, antibiyotik gibi bir dizi ilacın polimorf nüveli lökosit (PNL) ve makrofaj gibi immün sistem hücrelerini ve sitokinlerin fonksiyonlarını etkilediği, toksik etki, allerjik reaksiyonlar meydana getirdiği veya immün sistemi baskıladığı bildirilmiştir. Bu nedenle immün sistemi stimüle eden ajanlarla immünmodülasyon özellikle immün sistemi baskılanmış hastaların tedavisinde yeni bir strateji olarak görülmektedir (4).

Bu bilgilerin ışığı altında; bu çalışmada DDW'nin sağlıklı gönüllü PNL'lerinin fagositik ve hücre

içi öldürme aktiviteleri üzerine olumlu ya da olumsuz etkilerinin in vitro koşullarda araştırılması amaçlanmıştır.

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

### **PNL'lerin elde edilmesi**

Yaş ortalaması 20 olan 10 sağlıklı gönüllülerden alınan 10 ml venöz kan; içinde 0.1 g/ml etilendiamintetraasetik asit (EDTA) bulunan sili-konlu tüplere aktarılmıştır. Alınan kan 2500 rpm'de 30 dakika çevrilmiştir. İşlem sonrasında tüpün dibine çöken eritrositler ile tüpün üst kısmında bulunan plazma arasında sarımsı beyaz renkli bir tabaka (buffy coat) oluşmuştur. Bu tabaka pastör pipeti ile alınıp, içinde 2.5 ml ficoll-hypaque ve 2.5 ml polymorphoprep bulunan bir tüpe konulduktan sonra 3000 rpm'de 30 dakika çevrilmiştir. İşlem sonunda tüpün dibine çöken eritrositler ile üstteki monosit tabakasının arasında kalan PNL'ler pastör pipeti ile alınarak 2 ayrı tüpe eşit olarak paylaştırılmıştır. Tüplerden bir tanesinin içindeki PNL'ler, 3 kez 2000 rpm'de buz soğukluğundaki 3 ml normal su ile hazırlanan PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi, pH: 7.2) ile diğer tüp içindeki PNL'ler yine 3 kez 2000 rpm'de buz soğukluğundaki 3 ml DDW (29 ppm; Dr.Somyai, HYD Ltd, Hungry) ile hazırlanan PBS ile yıkanmıştır. Son aşamada normal su ile hazırlanan PBS ile yıkanan PNL'ler HBSS (Hanks'ın Dengeli Tuz Çözeltisi, pH: 7.4) ile; DDW ile hazırlanan PBS ile yıkanan PNL'ler ise DDW ile hazırlanan HBSS ile  $1 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. PNL sayımı thoma lamında yapılmıştır (5-7).

### **PNL canlılık testi**

PNL'ler, % 0.9 NaCl içinde hazırlanmış tripan mavisi (%0.5) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, mavi boyanan (ölü) ve boyanmayan (canlı) hücreler mikroskopta sayılmıştır (7).

### **Candida albicans standart suşunun hazırlanması**

*C. albicans* (ATCC 10231) standart suşu, Sabouraud dekstrozu sıvı besiyerine (SDB) pasaj yapılarak, 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 9.9 ml yeni bir SDB besiyerine maya kültüründen 1 pastör pipeti ilave edilerek 1 saat tekrar inkübe edilmiştir. Süre bitiminde sıvı kültür 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra dipte oluşan çökeltinin üzerine %0.9 NaCl konularak 2000 rpm'de 10 dakika süre ile 2 kez yıkanmıştır. Son aşamada ise maya hücrelerinin canlılığı metilen mavisi (%0.01) boyama yöntemi ile saptanmış ve maya hücrelerinin sayısı HBSS içinde  $1 \times 10^7$  maya/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (5,7).

### **Candida albicans opsonizasyonu**

Maya süspansiyonundan 1.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml steril taze insan serumu ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir (5).

### **Fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi tayini**

DDW'nin 10 sağlıklı gönüllünün PNL fonksiyonları (fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi) üzerine in vitro etkisi 2 ayrı seri tüpe araştırılmıştır. Her bir tüpe 300 µl PNL ( $1 \times 10^7$  hücre/ml) konulmuştur. Daha sonra birinci tüpe kontrol amaçlı 300 µl HBSS, ikinci tüpe ise 300 µl DDW ile hazırlanmış HBSS ilave edilmiştir. Hazırlanan seri tüpler 37°C'de opsonize maya ilave edilmeden çalkalayıcı etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda her bir deney tüpüne 400 µl opsonize maya hücresi ( $1 \times 10^7$  maya/ml) konulup aynı ortamda tüpler tekrar 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 25'inci dakikasında her bir tüpe fagosite olan ve PNL'ler tarafından öldürülen mayaların boyanması için 1 ml metilen mavisi (% 0.01) ilave edilmiştir. İnkübasyonun 30. dakikasının sonunda karışımdan lam-lamel arası pre-

parat hazırlanmış, 100 adet PNL içinde fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitesi gösteren PNL'ler mikroskop altında (X40 büyütme) sayılmıştır.

Fagositik aktivite tayininde; canlı (boya almayan) maya hücrelerini fagosite etmiş olan PNL'ler sayılmış, hücre içi öldürme aktivitesi tayininde ise PNL'ler tarafından öldürülen (mavi boyanmış) maya hücrelerini içeren PNL'ler sayılarak % cinsinden ifade edilmiştir (5).

### **İstatistiksel analiz**

Değerler yüzde oranı  $\pm$  standart sapma olarak ve 10 ayrı sağlıklı gönüllü PNL'lerle yapılan deneyin ortalaması alınarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılmıştır.

## **BULGULAR**

DDW ile işlem görmüş PNL'ler, kontrol PNL'ler ile karşılaştırıldığında DDW'nin fagositik aktivite ve hücre içi öldürme aktivitelerini değiştirmedeği saptanmıştır. ( $p > 0.05$ ) (Tablo 1, Grafik 1 ve Grafik 2).

**Tablo 1.** DDW'nin sağlıklı gönüllü (n=10) PNL'lerinin fagositoz ve hücre içi öldürme aktiviteleri üzerine etkisi

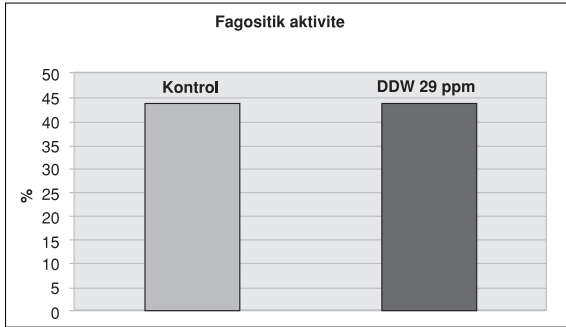
Deney	Fagositik aktivite* %	Hücre içi Öldürme Aktivitesi* %
Kontrol	44.10 $\pm$ 6.03	2.90 $\pm$ 1.52
DDW (29 ppm)	44.10 $\pm$ 6.47	2.00 $\pm$ 1.05

DDW: Döteryumu azaltılmış su, PNL: polimorf nüveli lökosit  
\* $p > 0.05$

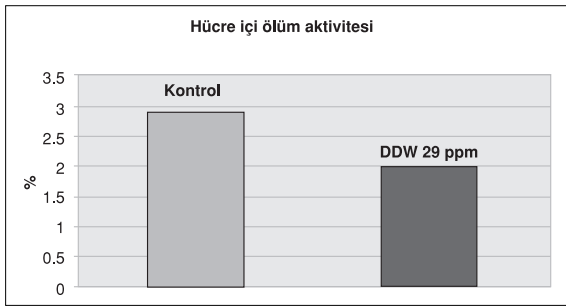
## **TARTIŞMA**

Tüm yüzey ve yer altı sularının %99.9'da sağlığını düzenleyen 150 ppm döteryum bulunmaktadır. Dünyada döteryum içermeyen veya düşük olarak (30 ppm'den daha az) içeren su nadir ve son derece sınırlıdır (8).

Su her yerde deva olup, yaşamın başladığı ve en ilkel canlı şekillerinin halen suda yaşadığı bir



**Grafik 1.** Kontrol ve DDW'nin (29 ppm) sağlıklı gönüllülerin (n=10) PNL'lerinin fagositik aktivitesi üzerine etkisi  
DDW: Döteryumu azaltılmış su



**Grafik 2.** Kontrol ve DDW'nin (29 ppm) sağlıklı gönüllülerin (n=10) PNL'lerinin hücre içi öldürme aktivitesi üzerine etkisi  
DDW: Döteryumu azaltılmış su

yerdir. Tüm canlı şekilleri suya bağlıdır ve bazıları ise su olmadan fonksiyonlarını yapamazlar. Hayvanlar ve insanların vücutlarının çoğu sudan yapıldır ve su tüm canlılar için gereklidir. Suyun önemini gösteren en yaygın komplikasyon ise dehidratasyondur. Vücut ağırlığının çoğu sudan oluşmuştur ve vücudumuza en uygun suyu sağlamak çok önemlidir. Bizler modern çağımızda en uygun suyu sağladığımıza inanıyoruz. Su kanser dahil çok ciddi hastalıklarla savaşmak için vücuda yardım ediyor. Vücut baskı altında olduğu zamanlarda bile, su ekstra enerji ve bol oksijen sağlar. Su zayıflamış immün sistemi restore eder ve hastalıklar ile savaşta ve vücudun kendi kendini rejenere etmesini kolaylaştırır. Su canlı doku hücrelerine girer girmez canlı hücrelerdeki fiziksel ve kimyasal işlemlerle uyum içinde vücudu toksinlerden arındırmak için sinir sistemi üzerine yatıştırıcı

bir etki ile artan konsantrasyonda artmış bir enerji seviyesi sağlayarak vücudu restore edebilir (9).

Sağlıklı kan hücrelerine etki etmeden vücuttaki hastalıklı hücreleri etkileyen DDW'i tüketerek kanser tedavisinin yapılacağı moleküler biyolog Dr.Somyai tarafından ortaya atılmıştır. Genellikle doğal su 150 ppm bir hidrojen izotopu olan döteryum içerir. 1993'de başlayan araştırmalar ile DDW'nin doku kültürlerinde hücre büyümesini geciktirdiği gösterilmiştir. Deney hayvanlarında immün sistemi baskılanmış kedi, köpek ve fare gibi deney hayvanlarında oluşan spontan tümörlerde ve insan kökenli kötü huylu hücre serisinden oluşturulmuş tümörler üzerine DDW'nin üremeyi yavaşlatıcı etkisi görülmüştür (10).

Somyai ve arkadaşları (10) yaptıkları bir çalışmada fibroblast kültürlerindeki medyum içeriğindeki döteryumun hücre çoğalmasında rol oynadığını göstermişlerdir.

Farelerle yapılan hayvan deneylerinde DDW'nin farelere ağızdan verilmesi yolu ile vücuttaki döteryumun dereceli olarak tüketilişi başarılı bir şekilde test edilmiştir. Aynı araştırmacılar normal içme suyunu DDW ile değiştirdiklerinde immün sistemi baskılanmış farelerde insan orijinli neoplastik hücre serisinden meydana getirilmiş tümör üremesini inhibe ettiğini ve bu etkinin DDW ile tedavi edilen hayvan grubunda anlamlı bir hayatta kalma avantajına dönüştüğünü göstermişlerdir.

Macaristan Budapeşte'de hasta insanlar üzerinde terapötik döteryumun yararını değerlendirmek üzere faz II klinik çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışma Macaristan'da 3 onkoloji merkezindeki 70 prostat kanserli hastalarda ve plasebo üzerinde DDW'nin terapötik etkinliğini ve güvenliğini doğrulamak amacı ile yapılmıştır. Bu hastalar klasik kanser tedavisine ek olarak içme

suyu olarak DDW aldıklarında plaseboya karşı DDW'nin istatistiksel olarak anlamlı yararı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca DDW'nin ilaçlarla ilişkili bir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir (2).

Sonuç olarak; Çalışmamızda 29 ppm DDW'nin sağlıklı gönüllü PNL'lerinin hem fagositik hem de hücre içi öldürme aktivitelerini değiştirmede ve her iki PNL fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemediği saptanmıştır.

### İletişim / Correspondence

Ümran Soyoğul Gürer  
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji AD  
Tel: 0216 414 29 62/102  
e-mail:umran.gurer@superonline.com

### Kaynaklar

1. Berdea P, Dobrota C, Cosma C, Cuna S. Growing rate decrease of the maize embryos sprouted in deuterium-depleted water (20 ppm). XXXI Colloquium Spectroscopicum Internationale; 5-10 September 1999; Ankara: Türkiye.
2. New Anti-Cancer European Technology Now Available in the U.S. 2010 [http://www.prweb.com/releases/2005/11/prweb313128.htm].
3. Alternative deuterium depleted functional water, oxygen-enriched within a special magnetic field to help the body to fight cancer and other invasive diseases. 2010 [http://www.deuterium aquavital.com/case history.pdf].
4. Labro MT, Benna JE, Abdelghaffar H. Modulation of human PNL function by macrolides: preliminary data concerning diritromycin. J Antimicrob Chemother 1993; (Suppl 3):S51-64.
5. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PH. Effect of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:196-201.
6. Alexander JW, Windhorst DB, Good RA. Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease. J Lab Clin Med 1968; 72:136-48.
7. Gürer SÜ, Çevikbaş A, Johansson C, Derici K, Yardımcı T. Effect of fluconazole on human polymorphonuclear leucocyte functions ex vivo against Candida albicans. Chemotherapy 1999; 45:277-83.
8. Locates Water Groundwells Anywhere or Any Toxic Site. 2010 [http://findh-2o.tripod.com].
9. Research and Case Histories of Application and Extended Case Histories in Human Trials. 2010 [http://www.deuteriumaquavital.com/case history.pdf ].
10. Somlyai G, Jancso G, Jakli G, Vass K, Barna B, Lakics V and Goal T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. FEBS Lett. 1993; 317 (Suppl 1):S1-4.