

KÓRÉLETTAN
PATHOPHYSIOLOGYA szervezet szubnormális deutériumszintjének kedvező élettani hatása a glükóztoleranciára, valamint a szérum HDL- és Na⁺-koncentrációraEffect of subnormal level of deuterium on glucose tolerance, serum HDL- and Na⁺-concentrationSOMLYAI GÁBOR¹, MOLNÁR MIKLÓS², SOMLYAI ILDIKÓ¹, FÓRIZS ISTVÁN³, CZUPPON GYÖRGY³, BALOG KRISZTINA¹, ABONYI ORSOLYA¹, KREPELS KRISZTINA¹¹HYD Rákkutató és Gyógyszerfejlesztő Kft., Budapest,²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kórélettani Tanszék, Kórélettani Intézet, Budapest,³Magyar Tudományos Akadémia, Csillagászati és Földtudományi Kutatóközpont Földtani és Geokémiai Intézete, Budapest¹HYD LLC for Cancer Research and Drug Development, Budapest, Hungary²Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary³Research Centre for Astronomy and Earth Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

Összefoglalás: A vizsgálatban 30, csökkent glükóz-toleranciájú önkéntes bevonásával azt kívántuk vizsgálni, hogy a csökkentett deutériumtartalmú víz (DDW) 90 napos fogyasztása hatással van-e az inzulinrezisztenciával összefüggő élettani paraméterekre. Valamennyi beteg napi 1,5 liter 104±1 ppm deutérium-koncentrációjú DDW-t fogyasztott ivóvízként. Az önkéntesek vérszérumának D-koncentrációja a kezdeti 147,5±0,8 ppm-ről a vizsgálat végére 133,9±4,1 ppm-re csökkent ($p<0,0001$), az átlagos testtömeg a vizsgálat során minimális, de szignifikáns emelkedést mutatott (0. nap: 85,55±13,3 kg, 90. nap: 86,71±12,8 kg, $p=0,014$). A 30 önkéntes esetében a vörösvértest-, fehérvérsejt- és trombocitaszám valamint a hemoglobinnérték a normálértéken belül kissé, de szignifikánsan emelkedett. A szérum Na⁺-koncentráció átlaga 141,11±2,4 mmol/l-ről 139,03±2,0 mmol/l-re csökkent a vizsgálat 90. napjára ($p<0,0001$). A vizsgálat során a HDL esetében tapasztaltunk lényeges, szignifikáns változást, melynek átlagos koncentrációja 1,05±0,45 mmol/l-ről 1,34±0,40 mmol/l-re emelkedett ($p=0,002$). Az éhomi vércukorérték a 90 napos DDW kezelés után szignifikáns mértékben csökkent (0. nap: 6,06±0,66 mmol/liter, 90. nap: 5,74 ± 0,94 mmol/liter, $p=0,029$). Az intravénás glükóztolerancia teszt (IVGTT) 0 perces adatait személyenként elemezve azt tapasztaltuk, hogy az inzulinkoncentráció 15 esetben emelkedett (0. nap: 9,9±3,4 μU/ml, 90. nap: 15,8±10,9 μU/ml, $p=0,056$) és 15 esetben csökkent (0. nap: 18,0±13,3 μU/ml, 90. nap: 7,7±4,3 μU/ml, $p=0,007$). Az inzulinkoncentráció-csökkenést mutató csoport esetében szignifikánsan pozitív korrelációt ($p=0,008$) igazoltunk a vércukorértékek csökkenésével (0. nap: 5,58 mmol/l, 90. nap: 5,24 mmol/l).

A hiperinzulinémiás, euglikémiás glükóz clamp technika segítségével követve a teljes testtömegre vetített cukorfelvételt nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (0. nap: $M=7,8±2,5$ mg/ttkg/min, 90. nap: $M=7,3±2,5$ mg/ttkg/min, $p=0,228$), de az egyénenkénti elemzés alapján 11 esetben nőtt (0. nap: $M=6,9±2,4$ mg/ttkg/min, 90. nap: $M=8,6±2,5$ mg/ttkg/min, $p=0,0014$), 18 esetben pedig csökkent a cukorfelvétel (0. nap: $M=8,4±2,5$ mg/ttkg/min, 90. nap: $M=6,5±2,2$ mg/ttkg/min, $p=0,00004$).

EGÉSZSÉGTUDOMÁNY
HEALTH SCIENCE
Közlésre érkezett:
Submitted:
Elfogadva:
Accepted:

58/1 104-123 (2014)
58/1 104-123 (2014)
2014. szeptember 9
September 9 2014
2014. október 1
October 1 2014

Somlyai Gábor
1539 Budapest, Pf. 695.
e-mail: gsomlyai@hyd.hu

Azoknál a személyeknél, akiknél a DDW hatására csökkent az inzulinrezisztencia (az M érték nőtt), a szérum Na⁺-koncentráció alacsonyabb volt már a vizsgálat kezdetén is (0. nap: 139,95±2,1 mmol/l, 90. nap: 139,09±2,3mmol/l, p=0,23), a HDL-érték pedig magasabb (0. nap: 1,20±0,45 mmol/l), és nem változott a vizsgálat végére sem (90. nap: 1,17±0,35mmol/l, p=0,72). Ezzel szemben, akiknél a 90 napos DDW kezelés alatt nőtt az inzulinrezisztencia (csökkent az M érték), a szérum Na⁺-koncentráció magasabb volt (0. nap: 141,4±2,3 mmol/l), de szignifikáns mértékben (p=0,00003) csökkent (90. nap: 138,9±1,8mmol/l); a HDL értékük pedig alacsony volt, de szignifikánsan emelkedett, 0,95±0,43 mmol/l-ről 1,43±0,40 mmol/l-re (p=0,0002). Az a tény, hogy a DDW fogyasztása egyidejűleg befolyásolta a szérum HDL-, inzulin- és glükóz koncentrációt egyrészt megerősíti, hogy a metabolikus szindróma körébe tartozó élettani paraméterek összefüggnek egymással, de azt is felveti, hogy a szervezet D-koncentrációja hatással van ezen értékek alakulására.

Kulcsszavak: inzulinrezisztencia, csökkentett deutériumtartalmú víz, DDW, deutériummegvonás, HDL

Abstract: In the present study 30 volunteers with decreased glucose tolerance underwent 90 days long deuterium-depleted water (DDW) treatment and physiological parameters characteristic to insulin resistance were evaluated to investigate the impact of DDW on these parameters. Each patient took 1.5 L daily amount of DDW, containing 104±1 ppm deuterium (D). Serum D-concentration decreased from 147.5±0.8 ppm to 133.9±4.1 ppm during the study. The mean body weight showed significant increase during the clinical trial (day 0: 85.55±13.3 kg, day 90: 86.71±1.8 kg, p=0.014). In the volunteers red blood cell count, white blood cell count, platelet count and serum hemoglobin concentration changed significantly, but all values stayed in the physiological range. The average serum Na⁺ concentration decreased from 141.11±2.4 mmol/L to 139.03±2.0 mmol/L until day 90 of the study (p<0.0001). Significant changes were measured in the HDL concentration, the average of which increased from 1.05±0.45 mmol/L to 1.34±0.40 mmol/L (p=0.002). Fasting glucose level decreased significantly after 90 days long DDW treatment (day 0: 6.06±0.66 mmol/L, day 90: 5.74±0.94 mmol/L, p=0.029). Evaluating the serum insulin concentration in the entire cohort relative to the values at 0-minute during the intravenous glucose tolerance test (IVGTT), we found that serum insulin concentration increased in 15 volunteers (day 0: 9.9±3.4 μU/ml, day 90: 15.8±10.9 μU/ml, p=0.056), and decreased in 15 volunteers (day 0: 18.0±13.3 μU/ml, day 90: 7.7±4.3 μU/ml, p=0.007). In the group of patients with decreased insulin concentration significant (p=0.008), positive correlation was verified in the decrease of the serum glucose levels (day 0: 5.58 mmol/l, day 90: 5.24 mmol/l).

Using the hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamp technique there was no significant differences in glucose uptake by all tissues in the body (day 0: M=7.8±2.5 mg/kg/min, day 90: M=7.3±2.5 mg/kg/min, p=0.228). Evaluation of individual cases showed that glucose uptake increased in 11 volunteers (day 0: M=6.9±2.4 mg/kg/min, day 90: M=8.6±2.5 mg/kg/min, p=0.0014), and decreased in 18 volunteers (day 0: M=8.4±2.5 mg/kg/min, day 90: M=6.5±2.2 mg/kg/min, p=0.00004).

In those patients, whose insulin resistance decreased as a result of DDW administration (increased M value), the serum Na⁺ concentration was lower at the involvement in the study (day 0: 139.95±2.1 mmol/L, day 90: 139.09±2.3 mmol/L, p=0.23), HDL-value was higher (day 0: 1.20±0.45 mmol/L) and remained steady until the end of the study (day 90: 1.17±0.35 mmol/L, p=0.72). In contrast, patients showing increased insulin resistance (decreased M value) during 90 days long DDW administration had high initial serum.Na⁺- concentration (day 0: 141.4±2.3 mmol/L), which decreased significantly (day 90: 138.9± 1.8 mmol/L p=0.00003); and had low HDL-values, which showed significant increase from 0.95±0.43 mmol/L to 1.43±0.4 mmol/L (p=0.0002). The fact, that DDW consumption simultaneously effects HDL-, insulin-, and glucose concentration, confirmed the strong correlation between these physiological parameters that describe the metabolic syndrome and it also suggests, that D-concentration in the body might have an impact on the changes of these parameters.

Keywords: insulin resistance, deuterium, deuterium-depleted water, DDW, deuterium depletion

Bevezetés

A cukorbetegség kezelése egyre nagyobb terhet ró a fejlett és fejlődő világ országainak egészségügyére egyaránt. A cukorbetegség számának rohamos emelkedése a fejlett országokban elsősorban a populáció egyre nagyobb hányadánál jelentkező túlsúlyra, a fejlődő országokban (különösen az arab és afrikai országokban) pedig a táplálkozási szokásokban bekövetkező változásokra vezethető vissza. A betegség gyógyszeres kezelése négy fő stratégiára épül:

1. növelni a perifériás cukorfelvételt, miközben egyidejűleg gátolják a máj cukortermelését,
2. egyidejűleg gátolni a máj cukortermelését és a glükoneogenezist,

3. növelni az inzulinszekréciót,
4. növelni az étkezés utáni glükózeliminációt.

Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján lehetőség kínálkozik egy új, az eddigiektől eltérő elven és hatásmechanizmus szerint működő gyógyszeres család kifejlesztésére, mely a természetben jelen lévő nehézhidrogén, a deutérium (D) biológiai rendszerekben betöltött szerepének a felismerésére épül.

A természetben megtalálható D biológiai szerepét, a deutériummegvonás (D-megvonás) daganatellenes hatását számos közlemény tárgyalta részletesen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). A több, mint húsz évvel ezelőtt indult hazai kutatások elsődleges célja annak tisztázása volt, hogy az élőlényekben mintegy 12–14 mmol/L koncentrációban jelen lévő D, mely a 100%-os tömegkülönbségből adódóan jelentős eltérést mutat kémiai viselkedésében a hidrogénhez (H) képest (8, 9), befolyásolja-e a sejtélettani folyamatokat, betölt-e valamilyen szerepet ezen folyamatok szabályozásában.

A deutérium 1932-es felfedezését követően számos kísérletet végeztek, melyek során kimutatták, hogy a természetesnél jelentősen magasabb D-koncentrációnak (a természetes érték 100–1000-szerese) komoly, elsősorban toxikus biológiai hatása van, de ezeknek a vizsgálatoknak közös vonása volt, hogy nem tulajdonítottak élettani jelentőséget természetben jelen lévő D-nak (10, 11). Ezzel szemben a természetesnél alacsonyabb D-koncentráció értékekkel végzett vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a D lényeges szabályzó szereppel bír az alapvető élettani folyamatokban (1, 2, 3, 5, 6, 7).

Az eddig lefolytatott prospektív és retrospektív klinikai vizsgálatok megerősítették a D-csökkentés daganatellenes hatását, és szintén igazolták a preklinikai toxikológiai vizsgálatok eredményeit, mely szerint a csökkentett deutériumtartalmú víz (deuterium-depleted water, DDW) alkalmazása a fenti koncentráció-tartományban biztonságos (4, 12).

Bár az eddigi kísérletek és klinikai vizsgálatok elsődleges célja a D-megvonás daganatellenes hatásának igazolása volt, már korábban feltűnt, hogy a daganatos betegség mellett diabéteszben (diabetes mellitus, DM) is szenvedő betegeknél csökkentek a vércukorértékek a DDW alkalmazása során.

Később állati modellkísérletben igazoltuk, hogy a DDW csökkentette a streptozotocinnal cukorbetegé tett patkányok vércukorszintjét abban az esetben, ha a kísérleti állatok egyidejűleg inzulint is kaptak. (A kísérlet során egyidejűleg szignifikánsan csökkent a kísérleti patkányok HbA_{1c} és fruktózamin szintje is.) További kísérletek azt igazolták, hogy a DDW dóziszfüggő módon stimulálta a GLUT4 glükóz transzporter transzlokációját a soleus izom citoplazmájából a membránba (13). Ezen eredmények ismeretében indítottuk el helyi etikai bizottsági jóváhagyással a 3 hónapos, prospektív vizsgálatunkat. A vizsgálat célja az

volt, hogy megvizsgáljuk, a 104 ppm D-koncentrációjú DDW alkalmazása befolyásolja-e a csökkent glükóz-toleranciájú betegek glükózháztartását, az inzulinrezisztenciát, az inzulinkoncentrációt, a vércukorszintet, illetve növeli-e a sejtek cukorfelvevő képességét. A vizsgálat további célja volt, hogy vizsgálja a DDW-nek az egyéb élettani paraméterekre, pl. vérképre, májfunkcióra, zsíryanycserére gyakorolt hatását is.

Módszerek, betegbeválogatás, bevont betegek jellemzése, vizsgálati terv

A protokollnak megfelelően a vizsgálat célja 30 olyan, csökkent glükóztoleranciájú önkéntes bevonása volt, akik korábban nem részesültek semmilyen kezelésben glükóz intolerancia miatt. A beválogatási kritériumnak megfelelő személyeket (42 önkéntes) előzetes szűrés alapján (éhomi vércukorérték és orális glükóztolerancia-teszt, OGTT) válogattuk be a vizsgálatba. Tizenegy személyt magas éhomi vércukor (éhomi vércukor: 5,6–7,0 mmol/L, kóros éhomi vércukorérték, impaired fasting glucose, IFG), 10 személyt az OGTT során mért emelkedett vércukorérték miatt (2 órás vércukor: 7,8–11,1 mmol/L; kóros glükóztolerancia, impaired glucose tolerance, IGT) vontunk be a vizsgálatba, míg 9 személy esetében a vércukorértékek cukorbetegséget (FPG \geq 7,0 mmol/L, illetve 2 órás OGTT: \geq 11,1 mmol/É) (14), diabetes mellitust (DM) igazoltak. A bevont önkéntesek között 9 férfi és 21 nő volt. A testtömegindex (body mass index, BMI) alapján 13 személy tartozott a 30–35 közötti (elhízott), 6 személy pedig a 35–40 közötti (kórosan elhízott) tartományba. A 20–25 (normál) és 25–30 közötti (túlsúlyos) BMI-tartományba 4, illetve 7 önkéntes tartozott.

A vizsgálati terv szerint a bevont önkéntesek testtömegüktől függetlenül napi 1,5 liter 104 \pm 1 ppm deutériumtartalmú (D-tartalmú) ivóvizet fogyasztottak 90 napon keresztül. A protokollban rögzített vizsgálatok közül kettőt emelünk ki, az intravénás glükóztolerancia-tesztet (IVGTT) és a hiperinzulinémiás, euglikémiás glükóz clamp technikát (15), melyeket a 0. és a 90. napon végeztünk el. A hiperinzulinémiás, euglikémiás glükóz clamp technika lényege, hogy azt a cukormennyiséget mérjük, amely a folyamatos inzulin infúzióval biztosított hiperinzulinémia idején (steady-state hiperinzulinémia) tartósan stabilizálja a vércukorszintjét az 5,5 \pm 0,5 mmol/L normoglikémia szinten. A hiperinzulinémia (70–100 mE/L) következtében az endogén inzulin szekréció és a hepatikus glükózprodukciónak elhanyagolható szintre csökken. Az állandó vércukorszintet biztosító, kívülről bejuttatott glükóz mennyisége egyenlő a szövetek cukorfelvételével.

A „kompartmentális” cukorfelvétel meghatározáskor a DEXA-val (Dual Energy X-ray Absorptiometry) mért testösszetételt használtuk.

A vizsgálat további célja volt, hogy követve 65 egyéb élettani paraméter változását a vérben és a vizeletben, valamint a vérnyomás, testtömeg, éhomi vércukorszint-értékek alakulását, átfogó képet kapjunk az alacsonyabb D-szint, a D-megvonás fiziológiás hatásairól.

Eredmények

Szérum D-koncentráció változása

Mivel a vizsgálat elsődleges célja a D-koncentráció csökkenés hatásának igazolása volt, ezért valamennyi bevont önkéntes esetében megmértük a vérérszék D-koncentrációját (16, 17) a vizsgálat kezdete előtt és a 90 napos DDW kezelés után (I. táblázat). A vizsgálat megkezdése előtt a vérérszék D-koncentrációja szűk tartományon belül (146–150 ppm között), a vizsgálat végén 125 és 143 ppm között változott (1. ábra). A DDW 90 napig tartó fogyasztása átlagosan 13,6 ppm csökkenést eredményezett ($p < 0,0001$) a szérék D-koncentrációjában. A legkisebb mért egyéni változás 4 ppm, a legnagyobb 24 ppm volt.

I. TÁBLÁZAT: A 30 önkéntes szérék D-koncentrációjának változása 90 napos DDW kezelés (104 ± 1 ppm D) során

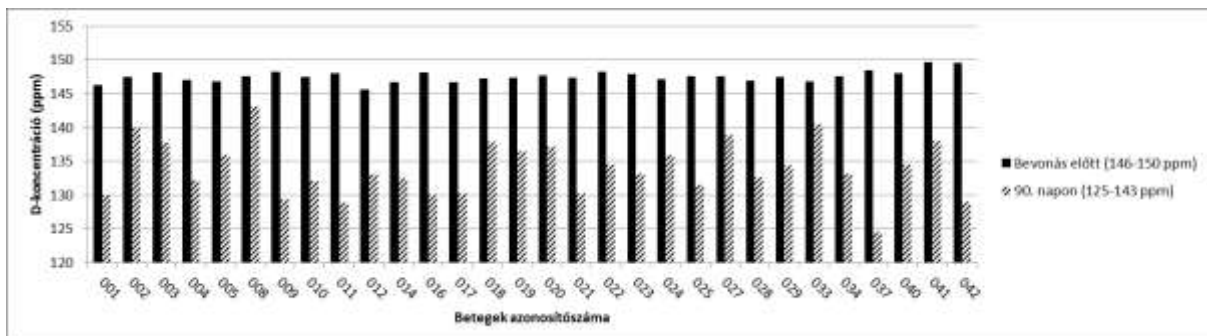
	Nap	N	Átlag	Szórás	95% konf. int.		Min.	Max.
					Alsó kritikus érték	Felső kritikus érték		
Szérék-D koncentráció (ppm)	0	30	147,567	0,897	147,231	147,902	146,0	150,0
	90	30	133,967	4,148	132,418	135,516	125,0	143,0

$p < 0,0001$

TABLE I: Changes in serum D-concentration in the 30 volunteers during the 90 days of DDW treatment (104 ± 1 ppm D)

	Day	N	Mean	SD	95% conf. int.		Min.	Max.
					Lower critical value	Upper critical value		
Serum D-conc. (ppm)	0	30	147.567	0.897	147.231	147.902	146.0	150.0
	90	30	133.967	4.148	132.418	135.516	125.0	143.0

$p < 0,0001$



1. ábra: A betegek szérumban D-koncentrációja a vizsgálatba való belépéskor és a 90. napon

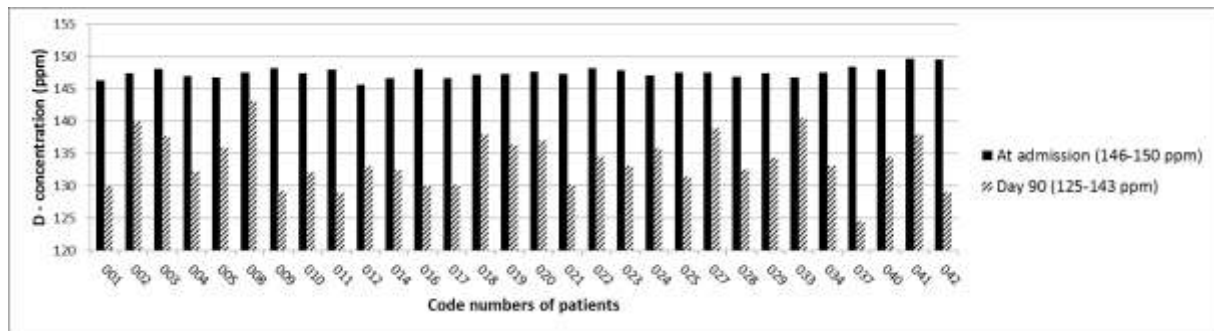


Fig. 1: Serum D-concentration values of the patients at admission and on the 90th day of the study

Testtömeg változása a vizsgálat során

A testtömeg csökkenése önmagában képes pozitív irányba befolyásolni az inzulinrezisztenciával összefüggő paramétereket, ezért a vizsgálat során követtük a 30 önkéntes testtömegének változását is. Azt tapasztaltuk, hogy a bevont személyek átlagos testtömege enyhe, de szignifikáns emelkedést mutatott a vizsgálat 90 napja alatt (0. nap: $85,55 \pm 13,3$ kg, 90. nap: $86,71 \pm 12,8$ kg, $p=0,014$). A testtömeg növekedése a szignifikánsan emelkedő zsírtömegre vezethető vissza (0. nap: $36,24 \pm 10,6$ kg, 90. nap: $37,30 \pm 10,4$ kg, $p=0,013$). Nemek szerinti bontásban vizsgálva a zsírtömeg változását csak a nők esetében volt szignifikáns annak növekedése ($p=0,007$), a férfiak esetében nem ($p=0,65$).

Vérkép, szérumban HDL és Na⁺-koncentráció változása a vizsgálat során

A 30 önkéntes esetében a vérkép több alkotója a határértéken belül, de szignifikánsan változott (II. táblázat). A vörösvértest-, fehérvérsejt- és trombocitaszám valamint a hemoglobin érték emelkedett.

II. TÁBLÁZAT: A 30 önkéntes vérkép értékeinek változása 90 napos DDW kezelés során

	nap	90. nap	p
WBC	6,48 10 ⁹ /L	6,96 10 ⁹ /L	0,01
RBC	4,52 10 ¹² /L	4,6610 ¹² /L	0,0064
HgB	8,36 mmol/L	8,61 mmol/L	0,011
PLT	251 10 ⁹ /L	269 10 ⁹ /L	0,007

TABLE II: Changes of the blood counts in the volunteers during the 90 days of DDW treatment

	Day 0	Day 90	p
WBC	6.48 10 ⁹ /L	6.96 10 ⁹ /L	0.01
RBC	4.52 10 ¹² /L	4.6610 ¹² /L	0.0064
HgB	8.36 mmol/L	8.61 mmol/L	0.011
PLT	251 10 ⁹ /L	269 10 ⁹ /L	0.007

A III. táblázatból kitűnik, hogy a szérum Na⁺-koncentráció átlaga 141,11±2,4 mmol/L-ről 139,03±2,0 mmol/L-re csökkent a 90. napra (p<0,0001). Az adatok szerint a 30 vizsgálati személy közül 27 esetében csökkent, 1 esetben nem változott és mindössze 2 esetben emelkedett a szérum Na⁺-koncentrációja. Egyetlen más követett paraméter esetében sem tapasztaltuk, hogy az a vizsgált személyek 90%-ánál azonos irányba változott volna a DDW hatására.

III. TÁBLÁZAT: Szérum Na⁺-koncentráció szignifikánsan csökkent a 90 napos DDW kezelés hatására

	Nap	N	Átlag	Szórás	95% konf. int.		Min.	Max.
					Alsó kritikus érték	Felső kritikus érték		
Na ⁺ (mmol/l)	0	30	141,11	2,4298	140,2	142,0	136,8	147,3
	90	30	139,03	2,0095	138,2	139,7	135,4	143,0

p[®]0,0001

TABLE III: Serum Na⁺-concentration significantly decreased during the 90 days of DDW treatment

	Day	N	Mean	SD	95% conf. int.		Min.	Max.
					Lower critical value	Upper critical value		
Na ⁺ (mmol/L)	0	30	141.11	2.4298	140.2	142.0	136.8	147.3
	90	30	139.03	2.0095	138.2	139.7	135.4	143.0

p^B0.0001

A vizsgálat során követett, a zsírsavcserevel összefüggő paraméterek (triglicerid, koleszterin, low-density lipoprotein (LDL), very-low-density lipoprotein (VLDL), high-density lipoprotein (HDL) közül csak a HDL esetében történt szignifikáns változás a 90 napos DDW kezelés során (IV. táblázat). A IV. táblázat adatai szerint a HDL átlagos koncentrációja 1,05±0,45 mmol/l-ről 1,34±0,40 mmol/l-re emelkedett (p=0,002). A HDL koncentrációja 22 esetben emelkedett, a 22 személy átlagos HDL-koncentrációja 0,90±0,36 mmol/l-ről 1,38±0,39 mmol/l értékre nőtt (p=0,0000041). A HDL-koncentráció nyolc esetben csökkent, de ezekben az esetekben a kiindulási HDL-érték a normál tartományban volt (1,44±0,43mmol/l), és abban is maradt a 90. napig (1,22±0,41 mmol/l, p=0,005).

Tekintettel arra, hogy a HDL esetében a nemek normálértéke különbözik, nemek szerinti bontásban is megnéztük a HDL koncentrációjának alakulását. Azt tapasztaltuk, hogy a HDL koncentrációjának emelkedése mindkét nem esetében szignifikáns volt. A nők esetében a kiindulási 1,11 mmol/L HDL-koncentráció 1,41 mmol/L-re (p=0,006), a férfiak esetében 0,89 mmol/L koncentrációról 1,16 mmol/L-re emelkedett (p=0,032) a vizsgálat során.

IV. TÁBLÁZAT: Szérum HDL alakulása a 90 napos DDW kezelés hatására

	Nap	N	Átlag	Szórás	95% konf. int.		Min.	Max.
					Alsó kritikus érték	Felső kritikus érték		
HDL (mmol/l)	0	30	1,05	0,45	0,88	1,21	0,35	2,10
	90	30	1,34	0,40	1,19	1,49	0,70	2,10

p=0,002

TABLE IV: Changes in serum HDL during the 90 days of DDW treatment

	Day	N	Mean	SD	95% conf. int.		Min.	Max.
					Lower critical value	Upper critical value		
HDL (mmol/L)	0	30	1.05	0.45	0.88	1.21	0.35	2.10
	90	30	1.34	0.40	1.19	1.49	0.70	2.10

p=0.002

Inzulinkoncentráció változása az IVGTT során a DDW-fogyasztás előtt és után

A clamp vizsgálat előtt a 0. napon és a vizsgálat végén, a 90. napon IVGTT-t végeztünk. Az inzulin koncentrációja a teljes populációt (30 személy) tekintve minimális mértékben, nem szignifikánsan csökkent (Wilcoxon-próba, $p=0,405$) a vizsgálat végére ($14,00\pm 10,4$ $\mu\text{U/ml}$ vs. $11,82\pm 9,1$ $\mu\text{U/ml}$). Összehasonlítva az inzulinkoncentráció 0 perces értékeit a DDW kezelés előtt és után, a bevont személyeket két csoportra lehetett osztani; a 0. perces inzulinkoncentráció 15 esetben nőtt, illetve 15 esetben csökkent (V. táblázat). Az inzulinkoncentráció-csökkenés szignifikáns volt ($p=0,007$), a növekedés azonban nem ($p=0,056$). Az inzulinkoncentráció-csökkenést mutató csoportban szignifikáns pozitív korrelációt ($p=0,008$) igazoltunk a vércukorértékek csökkenésével (0. nap: $5,58\pm 0,80$ mmol/L, 90. nap: $5,24\pm 0,48$ mmol/L).

V. TÁBLÁZAT: Az inzulinmennyiség változásának vizsgálata az IVGTT 0'-es időpontban megfigyelt inzulinmennyiség változása szerinti csoportbontásban

az IVGTT 0'-es időpontban az inzulin mennyisége		N	Átlag	Szórás	95% konf. int.		Min.	Max.
					Alsó küszöb	Felső küszöb		
csökkent	0. nap	15	18,05	13,38	10,64	25,46	5,47	47,85
	90. nap	15	7,75	4,39	5,31	10,18	,82	15,01
							p= 0,007	
nőtt	0. nap	15	9,96	3,43	8,06	11,86	1,13	15,21
	90. nap	15	15,89	10,951	9,83	21,96	8,11	54,00

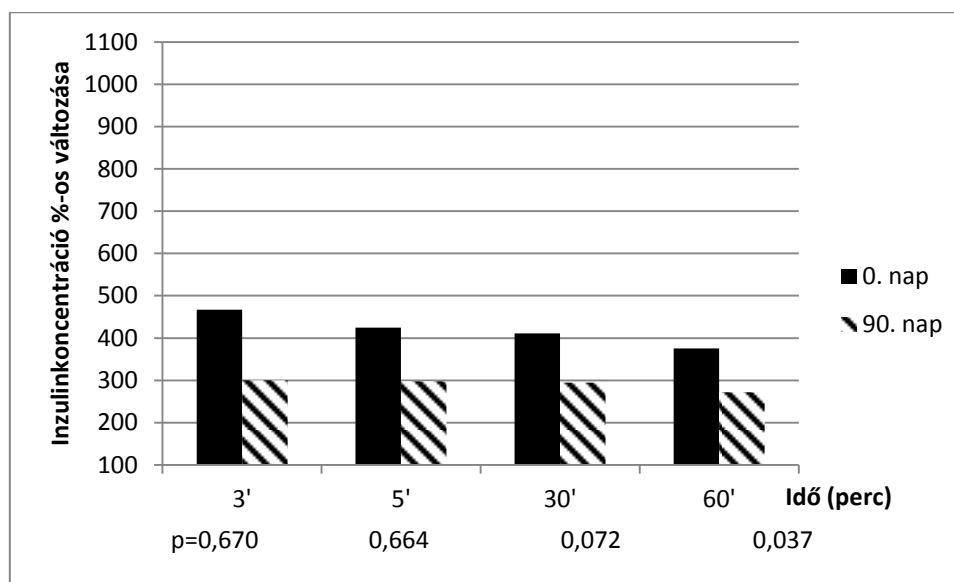
p=0,056

TABLE V: Analysis of change in insulin concentration (quantity?) measured in IVGTT at minute 0 grouped according to the direction of change

Quantity of insulin at 0' of IVGTT		N	Mean	SD	95% conf. int.		Min.	Max.
					Low threshold	High threshold		
decreased	Day 0	15	18.05	13.38	10.64	25.46	5.47	47.85
	Day 90	15	7.75	4.39	5.31	10.18	.82	15.01
							p= 0.007	
increased	Day 0	15	9.96	3.43	8.06	11.86	1.13	15.21
	Day 90	15	15.89	10.951	9.83	21.96	8.11	54.00

p=0.056

A két csoport cukorterhelésre bekövetkező inzulinválasza szintén jelentős különbséget mutatott (2., 3. ábra). A DDW kezelés előtti indukció után 3 perccel az inzulinkoncentráció 4,1-, ill. 4,6-szeres emelkedést mutatott a két csoportban, de a vizsgálat végén az inzulinkoncentráció-csökkenést mutatócsoportban (a javuló β -sejt működést jelző első inzulinszekréciós fázis) 10-szeres, míg a másik csoportban mindössze 3-szoros inzulinkoncentráció-növekedést tapasztaltunk. A két csoport közötti különbség nem magyarázható az eltérő test- vagy zsírtömeg-változással, mert mindkét csoportban egyformán, átlagosan 1–1 kg-mal nőtt a zsírtömeg.



2. ábra: Az inzulinkoncentráció változása az IVGTT során (0. perc=100%) az inzulinkoncentráció emelkedését mutató csoportban

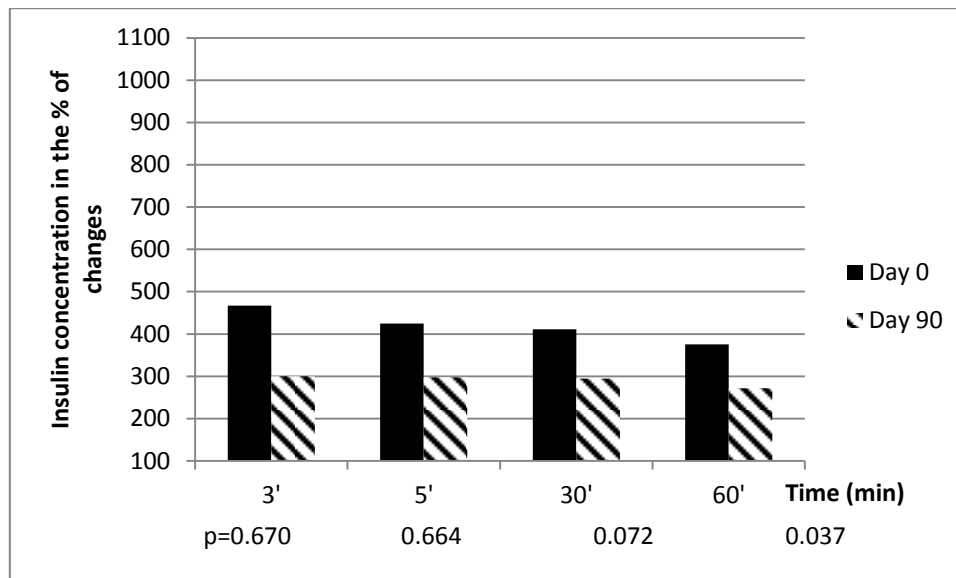
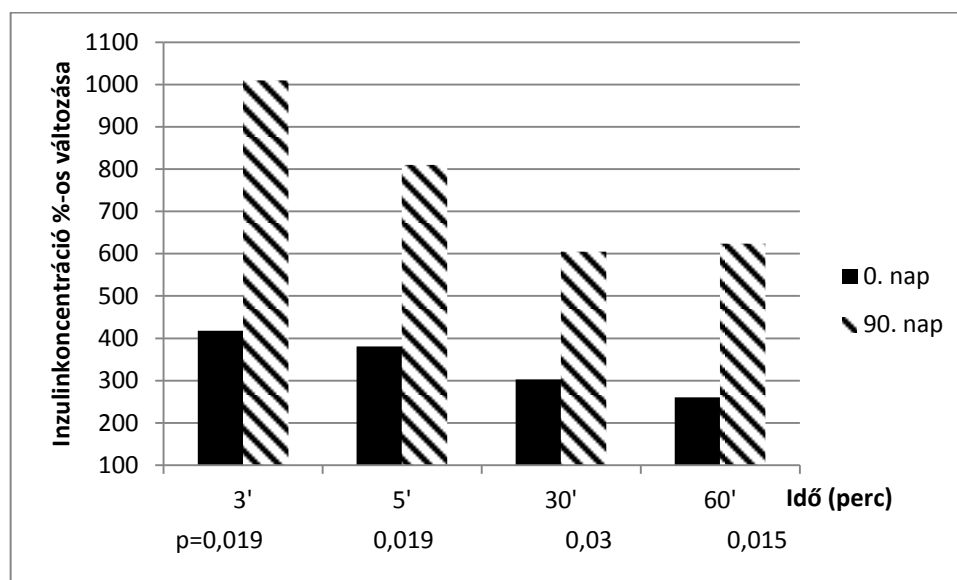


Fig. 2: Analysis of the changes in the concentration of insulin ($\mu\text{U}/\text{ml}$) measured in IVGTT ($0'=100\%$) in the group showing increasing insulin level



3. ábra: Az inzulin koncentráció változása az IVGTT során (0. perc=100%) az inzulin koncentráció csökkenését mutató csoportban

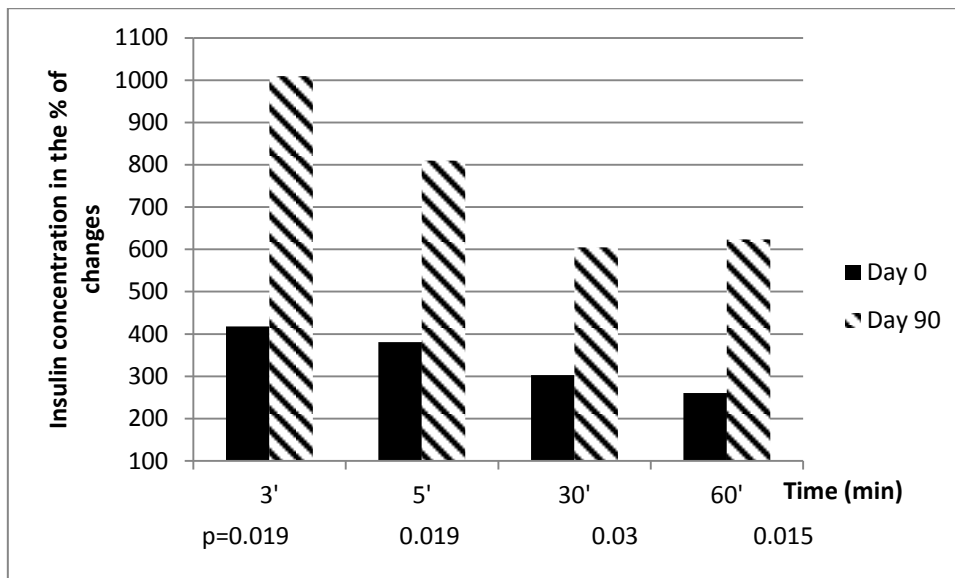
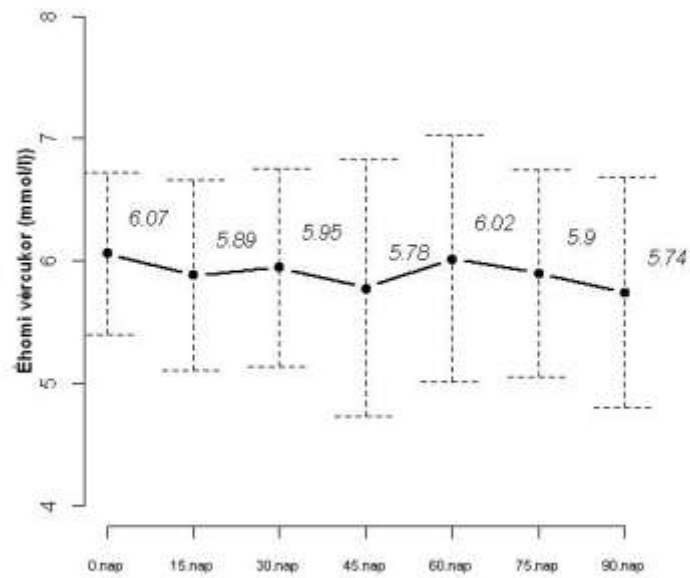


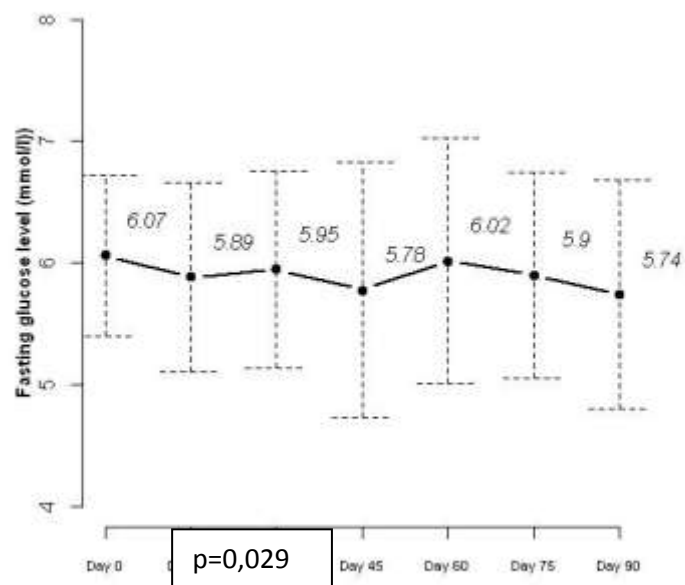
Fig. 3: Analysis of the changes in the concentration of insulin ($\mu\text{U}/\text{ml}$) measured in IVGTT ($0'=100\%$) in the group showing decreasing insulin level

Az éhomi vércukorértékek szignifikáns mértékben csökkentek a kezelés során

A bevont önkéntesek éhomi vércukorszintjét 15 naponta ellenőriztük (4. ábra). Az eredmények szerint a DDW kúra előtt a 30 önkéntes éhomi vércukorértéke $6,06 \pm 0,66$ mmol/L volt, ami a 90. napra $5,74 \pm 0,94$ mmol/L koncentrációra csökkent ($p=0,029$). Az ábrából kitűnik, hogy a vizsgálat 60. napján a vércukor átlagos koncentrációja $6,02$ mmol/L volt, miközben ezt megelőzően alacsonyabb értékeket mértünk. Ez a kiugró érték azzal magyarázható, hogy a betegbevonás október elején kezdődött, így a vizsgálat 60. napja a karácsonyi ünnepekre esett, amikor a vizsgálatban résztvevők kalóriabevitele várhatóan és feltételezhetően magasabb volt.



4. ábra: Az éhomi vércukor értékek változása a 90 napos DDW fogyasztás során



p= 0.02

Fig. 4. Changes in the fasting glucose levels during the 90 days of DDW treatment

IFG, IGT és DM betegek DDW hatására bekövetkező változásának az összehasonlítása

A vizsgálat egyik célja az volt, hogy megvizsgáljuk a DDW kezelés hatását a betegség különböző stádiumában lévő betegekre. A VI. táblázatban a három betegcsoport IVGTT alatt mért 0. perces, 3. perces inzulin- és vércukor értékeit mutatjuk be a vizsgálat előtt és 90 napos DDW fogyasztás után, valamint a glükózfelvételre (M), szérum Na⁺-ra és HDL-re vonatkozó értékeket foglaltuk össze. A vizsgálat előtti inzulin értékek összhangban vannak a három csoport besorolásával (IFG: 11,16±3,42 μU/ml, IGT: 14,50±8,07 μU/ml, DM: 18,75±16,06 μU/ml), tükrözve, hogy a diabétesz csoportnak a legmagasabb az inzulin koncentrációja. A három csoport közötti különbséget szintén jól mutatja a glükóz terhelésre adott inzulinválasz 3. percen mért adatai (IFG: 61,9 μU/ml, IGT: 48,4 μU/ml, DM: 28,1 μU/ml), az inzulinkoncentráció az IFG csoportban emelkedett a legmagasabbra, közel hatszorozódott az értéke, miközben a DM csoport esetében alig kétszeresére emelkedett. A csoportosítást támogatják a vércukor értékek (IFG: 5,4 mmol/L, IGT: 5,4 mmol/L, DM: 6,3 mmol/L).

Vizsgálva, hogy a különböző csoportokban a DDW milyen változást idézett elő, azt látjuk, hogy szignifikáns változás az inzulinkoncentráció vonatkozásában csak az IGT csoportban történt, ahol az inzulinkoncentráció értéke közel a felére csökkent (0. nap: 14,1±8,0 μU/ml, 90. nap: 8,6±5,1 μU/ml, p=0,042). A táblázatból kitűnik, hogy sem az éhomi vércukor, sem az inzulinrezisztencia mértékében nem történt a 3 hónap alatt egyik csoport esetén sem szignifikáns változás, Tovább elemezve a vizsgált paramétereket, ebben a csoportfelosztásban is a szérum Na⁺- és HDL értékek mutatnak markáns különbséget. A kiindulási HDL-koncentráció eltért a három csoportban (IFG: 1,05 mmol/L, IGT: 1,22 mmol/L, DM: 0,85 mmol/L). Feltűnő, hogy az inzulinkoncentráció tekintetében ebben a csoportbontásban is csak az IGT csoportban történt szignifikáns javulás a DDW fogyasztás alatt, ahol a HDL érték magas volt. Az adatokból ugyanakkor az is látszik, hogy a HDL-koncentráció mind az IFG és DM csoport betegeinél szignifikáns mértékben emelkedett. A szérum Na⁺-koncentráció mind a három csoportban a normál tartományon belül volt, de ezen belül az IFG és DM csoportok esetében szignifikánsan csökkent.

Perifériás cukorfelvétel változása a DDW fogyasztás előtt és után

A hiperinzulinémiás, euglikémiás glükóz clamp technika segítségével követve a zsír-, izom- és teljes testtömegre vetített cukorfelvételt, a 30 fős populációra nézve nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (0. nap: M=7,8±2,5 mg/ttkg/min, 90. nap: M=7,3±2,5 mg/ttkg/min, p=0,228) (VII. táblázat), de az egyénenkénti elemzés alapján 11 esetben nőtt (0. nap: M=6,9±2,4 mg/ttkg/min, 90. nap: M=8,6±2,5 mg/ttkg/min, p=0,0014), 18 esetben pedig csökkent a cukorfelvétel (0. nap: M=8,4±2,5 mg/ttkg/min, 90. nap: M=6,5±2,2

mg/ttkg/min, $p=0,00004$). (Egy betegnél nem sikerült megismételni a vizsgálatot a 90. napon, ezért 29 beteg adatait értékeltük.)

Következtetések

1993-ban jelent meg az első tudományos közlemény, mely felvetette, hogy az élő szervezetekben 12–14 mmol/L koncentrációban jelen lévő nehézhidrogénnek, a deutériumnak, kitüntetett szerepe lehet a sejtosztódás szabályozásában, a tumorigenezisben (1). Az elmúlt két évtizedben számos független közlemény is megerősítette az első eredményeket (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Bár a kutatások elsősorban a D-megvonás daganatellenes hatását igazolták, egyre több olyan közlemény is megjelent, amely a deutériummegvonás egyéb élettani hatásaira világított rá, így pl. az immunrendszer működésére (18) vagy az öregedéssel összefüggő folyamatokra gyakorolt hatásra (19). Az elmúlt két évtizedben nem történt megbízható, prospektív humán klinikai vizsgálat, ismereteink szerint eddig egy olyan közlemény került publikálásra, mely nagyszámú, DDW-t fogyasztó daganatos beteg prospektív klinikai elemzését mutatta be (4).

Patkánykísérletek és humán klinikai megfigyelések is igazolták (13), hogy a D-megvonás csökkenti a DM miatt kialakuló magas vércukorértékeket. Ezek az eredmények, klinikai tapasztalatok indokolták jelen prospektív klinikai vizsgálatunk lefolytatását. A vizsgálatba gyógyszeres kezelésben még nem részesült, csökkent glükóz-toleranciájú önkénteseket vontunk be annak eldöntésére, hogy a DDW-kezelés hatással van-e a vércukor- és inzulinkoncentrációra, valamint az inzulinrezisztenciára. A vizsgálat további célja volt felmérni a csökkent D-koncentráció hatását egyéb, vérből meghatározható paraméterekre annak érdekében, hogy átfogó képet kaphassunk a DDW általános élettani hatásairól.

Tekintettel arra, hogy a vizsgálatba bevont 30 személy a cukorbetegség kialakulásának különböző stádiumában volt (11 IFG, 10 IGT, 9 DM), a terveknek megfelelően a vizsgálat arra is fényt deríthetett, hogy a DDW a betegség melyik stádiumában alkalmazható a legnagyobb hatékonysággal. Mivel a DDW hatásmechanizmusa a D-koncentrációcsökkenés által indukált változásokra épül, ezért először a vészérum D-koncentrációjának változását határoztuk meg. Igazoltuk, hogy a 90 napos vizsgálat során a napi 1,5 liter 104 ppm-es DDW fogyasztása átlagosan több mint 13 ppm-es D-koncentrációcsökkenést okozott. A legnagyobb mért csökkenés 24 ppm, a legkisebb 4 ppm volt. A szervezet D-koncentrációjának csökkenése nem korrelált a testtömeggel, ezért az egyének közötti különbséget elsősorban az határozhatta meg, hogy a protokoll szerint előírt napi 1,5 liter DDW mellett milyen mennyiségben fogyasztott a beteg egyéb, normál D-tartalmú folyadékot, ill. mennyi és milyen összetételű táplálékot vett magához.

A DDW hatására mutatózó pozitív változások értelmezését megnehezítette volna, ha a kezelés ideje alatt jelentős testtömeg-csökkenést tapasztalunk, azonban a 30 bevont önkéntes testtömege inkább gyarapodott a 90 napos vizsgálat alatt (0. nap: $85,55 \pm 13,3$ kg, 90. nap: $86,71 \pm 12,8$ kg, $p=0,014$).

A vérképben tapasztalt nem jelentős, de szignifikáns kedvező változás megerősíti azokat a vizsgálati eredményeket, melyek szerint a DDW-nek nincs toxikus hatása. A vörösvértest, fehérvérsejt- és trombocitaszám minimális emelkedése összhangban van azokkal az onkológiai területen tett megfigyelésekkel, melyek szerint a citosztatikus kezelésben részesülő, mellette kiegészítő kezelésként DDW-t fogyasztó betegek esetében ritkábban következik be vérvépromlás, a kemoterápiát az esetek többségében a protokoll szerint lehet alkalmazni.

A vizsgálatban a szérum Na^+ -koncentráció szinte valamennyi önkéntesnél (30 közül 27-nél) csökkent, ez volt az egyedüli olyan paraméter, amely egységesen egy irányba változott. Ez az eredmény azért is különös jelentőséggel bír, mert már az első publikáció (1) is felvetette annak lehetőségét, hogy a Na^+/H^+ membrántranszport rendszernek a hatásmechanizmus szempontjából meghatározó szerepe lehet. Megalapozottan feltételezhető, hogy a H^+ -membrántranszport rendszer a könnyűhidrogént preferálja a hidrogén nehézizotópjával, a deutériummal szemben, és azáltal, hogy hidrogént távolít el a sejtől, a sejtben belül magasabb D/H arány jön létre, ami kihathat a sejtekben zajló genetikai- és biokémiai folyamatokra.

A H^+ -membrántranszport rendszerek szelektív működését igazolja, hogy az élesztő H^+ -ATPáz csak a hidrogént fogadja el szubsztrátjaként, a nehézhidrogént, a deutériumot, nem (21). Egy vízinövényekkel végzett kísérlet azt igazolta, hogy a víz D-koncentrációjának csökkentése azonnal aktiválta a H^+ -transzport rendszert, és a sejt intenzíven pumpálta ki a H^+ -ionokat (22). Jelen klinikai vizsgálatunk eredményei alapján is azt feltételezzük, hogy a DDW aktiválta a Na^+/H^+ -antiporter rendszert, ami H^+ -t pumpál ki a sejtől, miközben Na^+ -t vesz fel, és ezáltal csökkenti a vérplazma Na^+ -koncentrációját.

A vizsgálat egyik meglepő eredménye a szérum HDL koncentrációjának jelentős emelkedése volt. Köztudott, hogy napjainkig nem áll rendelkezésre olyan gyógyszer, amely képes lenne jelentősen emelni a HDL koncentrációját, ezért a vizsgálatnak ezt a megfigyelését is további klinikai vizsgálatok során kell majd megerősíteni. A HDL-re vonatkozó eredményeinket ugyanakkor támogatja, hogy megfelelő patkány modellrendszerben szintén kimutatták a HDL-koncentráció emelkedését a DDW hatására, és ezzel egy időben az LDL koncentrációjának a csökkenését (20). A lipidanyagcseréhez kapcsolódó folyamatok esetében felmerül a kérdés, hogy hosszabb ideig tartó DDW kezelés

és/vagy eltérő D-koncentráció alkalmazása hatással van-e a VLDL-, LDL-, koleszterin- és trigliceridértékekre.

Az elvégzett IVGTT vizsgálat adatai alapján két, 15–15 fős csoportot tudunk képezni aszerint, hogy a cukorterhelés alatt hogyan változott az inzulin koncentrációja a 0. és a 90. nap között (a 0' mintához képest). Ennek megfelelően 15 esetben jelentős mértékben csökkent az inzulin koncentrációja, ami pozitív korrelációt mutatott a vércukorértékek csökkenésével. Ezekben az esetekben a 90 napos DDW kezelés után a cukorterhelést követő 3. percben az inzulinkoncentráció a nyugalmi érték 10-szeresére ugrott, miközben a DDW kezelés előtt ez az emelkedés mindössze 4-szeres volt.

A másik, inzulinkoncentráció emelkedést mutató csoporttal kapcsolatban ki kell emelni, hogy a vizsgálatba vont 9 cukorbeteg közül 6 ebbe a csoportba tartozott. Ez arra utalhat, hogy az alkalmazott D-koncentráció és a 90 napos DDW kezelés elsősorban az IFG és IGT stádiumban bevont személyek esetében bizonyult hatásosnak, de nem zárható ki, hogy egy hosszabb kezelési ciklus és/vagy eltérő D-koncentráció alkalmazása a diabéteszrel diagnosztizált esetekben is hatásos lehet. Ezt az is valószínűsíti, hogy 3 cukorbeteg önkéntes a jelentős inzulincsökkenést mutató csoportba tartozott. Az eredmények alapján elképzelhető, hogy a DDW alkalmazásával visszafordíthatók azok a folyamatok, melyek hosszú távon a diabétesz kialakulásához vezetnek.

Az IFG, IGT és DM csoportbontásban elemezve az adatokat érdemi változást csak az IGT csoportban tapasztaltunk, ahol az inzulin koncentrációja jelentősen csökkent. Figyelembe véve a fenti csoportosításoknál tapasztalt csoportok közötti különbségeket, talán nem meglepő, hogy a javulás annál a csoportnál következett be, ahol a HDL érték már a vizsgálat kezdetén is magas volt. Ezzel egy időben itt is azt tapasztaltuk, hogy a másik két csoportban a HDL értéke szignifikáns mértékben nőtt, miközben a szérum Na⁺ koncentrációja szignifikáns mértékben csökkent.

A vizsgálat során hiperinzulinémiás, euglikémiás glükóz clamp technikával követtük a szövetek cukorfelvevő képességét a DDW kezelés alatt, de a teljes populációra vonatkoztatva nem találtunk szignifikáns különbséget. Az egyénekenkénti vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy 11 esetben csökkent, 18 esetben pedig nőtt az inzulinrezisztencia.. Tekintettel arra, hogy olyan betegeket vontunk be a vizsgálatba, akiknél magas volt az éhomi és/vagy az OGTT terhelés utáni vércukor érték, de a beválogatási kritériumok további megkötéseket nem tartalmaztak, ezért egyéb paraméterekre nézve (BMI, inzulinrezisztencia mértéke, IFG, IGT, DM, HDL, stb.) jelentős eltérések mutatkoztak a bevont önkéntesek között.

Ez felvetette azt a kérdést, hogy a glükózfelvétel alapján két csoportra osztott személyek esetében köthető-e, illetve magyarázható-e az eltérő reakció a vizsgálat kezdetén eleve meglévő különbségekkel? Megvizsgálva valamennyi követett paraméter alakulását, a két

csoport jelentősen eltérő szérum Na⁺- és HDL-koncentráció értéket mutatott. Azoknál a személyeknél, akiknél a szérum Na⁺ a 0. napon alacsonyabb volt (139,95 mmol/L) és egyidejűleg a HDL értéke a normál tartományba esett (1,2 mmol/L), a DDW kezelés alatt csökkent az inzulinrezisztencia. Ezzel szemben, akiknél a szérum Na⁺-szint magasabb (141,4 mmol/L), a HDL-érték pedig alacsony (0,95 mmol/L) volt a vizsgálat kezdetén, azoknál nőtt az inzulinrezisztencia. A vizsgálat adatai szerint ezek az értékek ennél a csoportnál a másik csoport értékei irányába mutattak jelentős elmozdulást (szérum Na⁺ 138,9 mmol/L, HDL 1,43 mmol/L), az inzulinrezisztencia ennek ellenére mégis nőtt. Ez alapján a vizsgálat alapján, rövidege miatt, nem lehet kizárni annak a lehetőségét, hogy további 3-6 hónapos DDW kezelés az inzulinrezisztencia csökkenését eredményezte volna a csökkenő Na⁺- és az emelkedő HDL-koncentráció következményeképpen, ezért ez lehet az egyik elsődleges kérdés, amelyre a további, nagyobb esetszámmal lefolytatott vizsgálatoknak kell megadniuk a választ.

Klinikai vizsgálatunk eredményei is megerősítik azt a feltételezést, hogy a sejtekben létezik egy szubmolekuláris szabályozási mechanizmus (submolecular regulatory system, SMRS), amely a sejtekben meglévő és változó D/H-arányon keresztül befolyásolja a sejtek genetikai- és biokémiai folyamatait. Azt feltételezzük, hogy a sejtek a D/H arányt a H⁺-transzportrendszeren keresztül tudják szabályozni, a DDW kezeléssel előidézett D-koncentrációcsökkenést a H⁺-transzportrendszer aktiválásával tudják vagy próbálják helyreállítani, ill. azt, hogy a csökkenő D-koncentráció egyidejűleg számos változást indít el a sejtekben és a szervezet egészében.

A vizsgált paraméterekben bekövetkezett változások összhangban vannak az elmúlt több mint húsz év során lefolytatott genetikai-, biokémiai- és élettani kísérletek eredményeivel, és megerősítik a természetben jelen lévő D szerepét az élettani folyamatok szabályozásában. Az a tény, hogy a DDW fogyasztása egyidejűleg befolyásolta a HDL-, inzulin- és vércukorértékeket, egyrészt megerősíti, hogy a metabolikus szindróma körébe tartozó paraméterek összefüggnek egymással és szabályozásukban a szervezet D-koncentrációjának lényeges szerepe lehet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bemutatott klinikai vizsgálatot a *DRC Gyógyszervizsgáló Központ Kft.* (8230 Balatonfüred, Ady E. u. 12.) munkatársai végezték, akiknek ezúton szeretnénk köszönetet mondani a vizsgálat megszervezéséért és lebonyolításáért. A vérérum D-koncentrációjának a meghatározása a *Magyar Tudományos Akadémia Csillagászati és Földtudományi Kutatóközpont Földtani és Geokémiai Intézetében* (1112 Budapest, Budaörsi út 45.) történt. *Kovácsné Varga Katalinnak* köszönjük a vérérumból történő D-koncentráció meghatározása kapcsán végzett laboránsi segítséget.

IRODALOM

REFERENCES

- 1 Somlyai G. Jancsó G. Jákli Gy, et al.: Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. FEBS Letters 1993. 31. 1–4
- 2 Somlyai G. Laskay G. Berkény, T. et al.: Naturally occurring deuterium may have a central role in cell signalling. In: Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds (Ed.: J. R. Heys és D.G. Mellilo) John Wiley & Sons Ltd. New York, 1998
- 3 Somlyai G. Laskay G. Berkényi T. et al.: The Biological Effects of Deuterium-Depleted Water, a Possible New Tool in Cancer Therapy. Z. Onkol. /J. Oncol. 1998. 3. 4 Kovács A. Guller I. Krempels K. et al.: Deuterium depletion may delay the progression of prostate cancer. J. Cancer Ther., 2011. 2. 548-556
- 4 Gyöngyi Z. Somlyai G.: Deuterium depletion can decrease the expression of c-myc, Ha-ras and p53 gene in carcinogen-treated mice. In Vivo 2000. 14. 437–440[6]
- 5 Siniak Iu.E. Turusov V.S. Grigoriev A.I. et al.: Consideration of the deuterium-free water supply to an expedition to Mars, Aviakosmicheskaia i Ekologicheskaja Meditsina /Aerospace Environ. Med. 2003. 37. 60–63
- 6 Cong F.S. Zhang Y.R. Sheng H.C. et al.: Deuterium-Depleted Water Inhibits Human Lung Carcinoma Cell Growth by Apoptosis. Exp. Ther. Med. 2010. 1. 277-283
- 7 Jancsó G.: Isotope Effects. In: Handbook of Nuclear Chemistry, Volume 2. (Eds: Vértes A. Nagy S. Klencsár Z.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, 2003. pp. 85-116
- 8 Collins C.J. Bowman N.S.: Isotope Effects in Chemical Reactions. Van Nostrand Reinhold. New York, 1971.
- 9 Katz J.J. Crespi H.L.: Isotope Effects in Biological Systems. In: Isotope Effects in Chemical Reactions. (Eds: Collins C. J., Bowman, N. S.). Van Nostrand Reinhold. New York, 1971. pp. 286-363
- 10 Rundel P.W. Ehleringer J.R. Nagy K.A.: Stable Isotopes in Ecological Research. Springer. New York, 1988.[12] Krempels K. Somlyai I. Somlyai G.: A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on four patients with brain metastases from lung cancer. Integrative Cancer Ther. 2008. 7(3). 172-181
- 11 Molnár M. Horváth K. Dankó T. et al.: Effect of deuterium oxide (D₂O) content of drinking water on glucose metabolism on STZ-induced diabetic rats. Proceedings of the 7th International Conference Functional Foods in the Prevention and Management of Metabolic Syndrome. 2010. 154-155
- 12 ADA expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 1997. 20. 1183-1197
- 13 DeFronzo R.A. Tobin J.D. Andres R.: Glucose Clamp Technique: a Method for Quantifying Insulin Secretion and Resistance. Am. J. Physiol. 1979. 237. E214–E223
- 14 Coleman M.L. Shepherd T.J. Durham J.J. et al.: Reduction of water with zinc for hydrogen isotope analysis. Anal. Chem., 1982. 54. 993-995

- 15 *Schoeller D.A. van Santen E. Peterson D.W. et al.:* Total body water measurement in humans with ¹⁸O and ²H labeled water. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980. 33. 2686-2693
- 16 *Bild W. Stefanescu I. Haulica I. et al.:* Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water. *Romanian J. Physiol.* 1999. 36. 205–218
- 17 *Avila D.S. Somlyai G. Somlyai I. et al.:* Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. elegans* model. *Toxicol. Lett.* 2012. 211(3). 319-324. Epub 2012 Apr 26
- 18 *Lei C.Y. Shen C.H. Lu Z.M. et al.:* Effects of deuterium depleted water and liquor on lipid metabolism in rats models of hyperlipidemia. *Chin. J. Arterioscler.* 2011. 19. 819-824
- 19 *Kotyk A. Dvorakova M. Koryta J.:* Deuterons cannot replace protons in active transport processes in yeast. *FEBS Letters.* 1990. 264(2). 203-205
- 20 *Laskay G. Somlyai G. Jancsó G.:* Reduced deuterium concentration of water stimulates O₂-uptake and electrogenic H⁺-efflux in the aquatic macrophyte *Elodea Canadensis*. *Jpn. J. Deuterium Sci.* 2001. 10. 17-23