

A Kaqun víz hatása egészséges önkéntesek immunológiai paramétereire

Biró Anna dr.¹ ■ Tompa Anna dr.^{1,2}

¹Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Citogenetikai és Immunológiai Csoport, Budapest
²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Népegészségtani Intézet, Budapest

Bevezetés: A Kaqun víz stabil, oldott formában tartalmaz nagy mennyiségű oxigént, amely a bőrön és emésztőrendszeren keresztül a szervezetbe jutva megemeli a szövetek oxigéntartalmát. **Célkitűzés:** A szerzők 21 napos Kaqun-terápia egészséges önkéntesek immunológiai paramétereire kifejtett hatásának vizsgálatát tűzték ki célul. **Módszer:** Immunfenotipizálással meghatározták a lymphocytá-populációk arányát, CD25 és CD71 aktivációs antigénnel felmérték a lymphocyták aktiváltságát, illetve megmérték a neutrophil granulocyták ölképességével arányos reaktív oxigén intermedier termelést. Az adatokat ismételt méréses varianciaanalízissel elemezték. **Eredmények:** A neutrophil granulocyták reaktív oxigén intermedier termelése szignifikánsan nőtt a stimulált mintákban három hét Kaqun-kezelés alatt. Szintén emelkedett a CD25 aktivációs antigént kifejező T-, illetve helper T-lymphocyták százaléka, illetve az NK-sejtek aránya. **Következtetések:** A Kaqun-terápia által megemelt oldottoxigén-koncentráció számos immunológiai funkcióra hatással van: a neutrophil granulocyták ölképességének fokozódását, a T-lymphocyták aktivációját, vagyis az immunválasz aktivitásának növekedését okozza, és növeli az NK-sejtek előfordulását, ami a vírussal fertőzött vagy tumoros sejtek elpusztítását segítheti elő. *Orv. Hetil., 2014, 155(24), 949–953.*

Kulcsszavak: Kaqun víz, immunfenotipizálás, leukocytá-ölképesség, NK-sejt

The effect of Kaqun-water on the immune parameters of healthy volunteers

Introduction: Kaqun-water contains a high amount of stable oxygen, which absorbed through the skin and intestinal tract, increases tissue oxygenation. **Aim:** The aim of the authors was to evaluate the effect of 21 days of Kaqun-water treatment on the immune parameters of healthy volunteers. **Method:** Subpopulations of lymphocytes were determined by immune phenotyping, and CD25 and CD71 activation antigens were used to assess lymphocyte activation. Production of reactive oxygen intermediates was measured to determine the killing capacity of neutrophil granulocytes. Data was analysed with repeated measures ANOVA. **Results:** The reactive oxygen intermediate production of neutrophils increased significantly in stimulated samples during three weeks of Kaqun-water treatment. The percent of activated, CD25 positive T and helper T cells, and the ratio of NK cells increased. **Conclusions:** The increase in oxygen concentration caused by Kaqun-water treatment affects several immune functions: the killing potential of neutrophil granulocytes is enhanced, the activation of lymphocytes shows an increased activity of immune function, and the elevated ratio of NK cells may help combat virally infected and tumorous cells.

Keywords: Kaqun-water, immune phenotyping, oxidative burst, NK cell

Biró, A., Tompa, A. [The effect of Kaqun-water on the immune parameters of healthy volunteers]. *Orv. Hetil., 2014, 155(24), 949–953.*

(Beérkezett: 2014. április 7.; elfogadva: 2014. április 30.)

Rövidítések

fMLP = formil-methionil-leucil-fenilalanin; HBO = oxigénkamrában végzett hyperbaricus oxigénterápia; OMFI = Országos Munkahigiénés és Foglalkozás-egészségügyi Intézet; ROI = reaktívoxigén-intermedier, PMA = forbol-mirisztol-acetát

Az oxigenizációval kapcsolatos irodalomban elsősorban oxigénkamrában végzett hyperbaricus oxigénterápiával (HBO) foglalkozó cikkek lelhetők fel. Ezt a módszert hypoxiás daganatok esetén a terápiás besugárzás és kemoterápia hatásának fokozására [1, 2], a besugárzás szö-

vódményeinek kivédésére és kezelésére [1, 3], valamint sebgyógyulás elősegítésére [4] használják, ez utóbbi hatás többek között azzal magyarázható, hogy a hyperoxia és az ennek köszönhető szöveti oxigénszint-emelkedés elősegíti a leukocyták oxigéndependens ölükéességét [5].

Az utóbbi években kísérletek történtek a hiperoxigenizáció respiratorikus rendszert kikerülő eljárásának kidolgozására. Az oxigénnel dúsított víz fogyasztása és hidromasszázs-ként történő alkalmazása is ilyen eljárás. Az ilyen kombinált eljárással 3 hétig kezelt túlsúlyos személyek testtömege, testzsír-százaléka és testtömegindexe szignifikáns mértékben csökkent [6].

Kísérleteinkben az előzőhöz hasonló eljárású kezelést alkalmaztunk. A Kaqun speciális, magas oxigéntartalmú víz, amely ivó- és/vagy fürdőkúra formájában hasznosítható. A Kaqun víz stabil, oldott formában tartalmaz nagy mennyiségű oxigént, amely a bőrön és emésztőrendszeren keresztül a szervezetbe jutva megszünteti a szöveti és sejtszintű acidózist és hypoxiát. Az egészségi állapottól függően a szervezet változó mennyiségű oxigén felvételére képes az oldott oxigénből. Vizsgálatunkban 21 napos fürdő-, illetve párhuzamos ivókúra hatását vizsgáltuk egészséges önkéntesek immunológiai paramétereire. Az immunrendszer állapotát a perifériás vérből nyert fehérvérsejtek jellemzésével írtuk le [7, 8]. Egyrészt meghatároztuk a fehérvérsejtek minőségét és mennyiségét, másrészt sejtfelszíni molekulák ellen termelt monoklonális ellenanyagok segítségével, immunfenotipizálás módszerével meghatároztuk a lymphocytaszubpopulációkat, és a lymphocytákon kimutatható CD25 (IL-2R) és CD71 (transzferrinreceptor) aktivációs antigéneket. A természetes immunitást egy funkcionális vizsgálat segítségével jellemeztük: a fehérvérsejtek ölükéességét határoztuk meg a granulocyták reaktív oxigén intermedier (ROI) termelésének mérésével [8]. A vizsgálathoz ETT etikai engedély volt szükséges, ennek száma: 42/2009.

Módszer

A vizsgálatban részt vevő egészséges önkéntesek

A 30 fő (15 nő, 15 férfi) egészséges önkéntes kiválasztását a Kaqun Hungária Kft. végezte. A résztvevőket tájékoztatták a vizsgálatok céljáról és menetéről, és egy beleegyező nyilatkozatot írtak alá, amellyel igazolták, hogy tájékoztatást kaptak a vizsgálatról és abban önként vesznek részt. A résztvevők kiválasztásánál kizáró okok a következők voltak: akut vagy krónikus betegség, fertőzés, bármilyen gyógyszer szedése, illetve a dohányzás, mivel ezek az immunológiai paramétereket befolyásolhatják. A vizsgálatból egy személyt ki kellett zárni súlyos immunológiai eltérés miatt. A nők átlagéletkora $44,2 \pm 3,1$, a férfiak átlagéletkora $42,1 \pm 3,0$ év volt.

A tanulmány időtartama, menete

A napi egyszeri, reggeli fürdés 37°C -os, stabil oxigént tartalmazó vízzel teli, egyedi fürdőkádban történt, alkalmanként maximum 50 percig. Az ivókúra napi 1,5 liter Kaqun ivóvíz elfogyasztását jelentette, párhuzamosan a fürdésekkel. A fürdőkúra a Kaqun Egészségprogram Szolgáltatási standardjaiban rögzítettek szerint folyt.

Vérvétel

Helyszíni vérvétel keretében: 1. nap a fürdés előtt (0 pont), majd a 8., 15., 21. napon a fürdést követően, azonos napszakban. A vérmintákat a vizsgált személyek vena cubitusából, ülő testhelyzetben, steril körülmények között, vénapunkcióval nyerték. A vérvételhez standard, alvadászátlóval ellátott 4 ml-es, steril vákuumos vérvételi csöveket használtak.

Neutrophil granulocyták ölükéességének mérése

A fehérvérsejtek ölükéességével arányos reaktív oxigén intermedier (ROI) termelést Bursttest (Phagoburst®) kit segítségével mértük. A heparinizált teljes vért a vérvétel után közvetlenül felhasználtuk. A neutrophil granulocyták aktiválásra reaktív-oxigén-intermedierek termelésével válaszolnak, amelyek oxidálják a fluorogén szubsztátot. Az átalakult szubsztát mennyisége arányos a keletkezett reaktív-oxigén-gyökök mennyiségével. A mérést áramlási citométeren végeztük. Megmértük az átalakult szubsztát mennyiségét a kontroll-, illetve a stimulált mintákban, valamint meghatároztuk a ROI-termelő sejtek százalékat. Az aktiváló stimulus: 1. fMLP kemotaktikus peptid (gyenge stimulus); 2. ellenanyaggal opszonizált *E. coli*, amely az ellenanyag konstans részét felismerő Fc-receptoron keresztül hat (particularis stimulus); 3. PMA (forbol-mirisztil-acetát), amely a proteinkináz C-n keresztül továbbít jelet (erős stimulus).

Immunfenotipizálás

A keringő lymphocyták alcsoportjait és aktiváltsági állapotát immunfenotipizálás módszerével határoztuk meg [7]. A méréshez heparinizált teljes vért használtunk. A vizsgálatok során perifériás lymphocyták felszíni markereit mértük fluoreszkáló festékekkel jelölt monoklonális ellenanyagok segítségével, áramlásos citofluoriméteren. A vizsgált felszíni antigének: CD3 (T-sejt-receptor), CD4 és CD8 (T-sejt-koreceptorok), CD19 (B-sejt-koreceptor), CD25 (interleukin-2-receptor), CD45 (protein-tirozin-foszfátáz, panleukocyt-marker), CD56 (neural cell adhesion molecule, NK-sejt-marker), CD71 (transzferrinreceptor). 3, illetve 4 színű jelölést alkalmazva a következő ellenanyag-kombinációkat használtuk: 1. CD25-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP/CD4-APC; 2. CD56-FITC/CD3-PerCP/CD45-APC; és 3. CD71-FITC/CD3-PerCP/CD19-APC. Standard elő-

re- és oldalszórás alapján, illetve CD45-pozitivitás alapján különböztettük meg a leukocytapopulációkat, illetve állítottuk be a lymphocytakaput. A donorok lymphocytápopulációit (T-lymphocytá, helper T-, citotoxikus T-, B-lymphocytá és NK-sejt) sejtvonalmarkerek segítségével határoztuk meg. A CD25 (IL-2R) és CD71 (transzferrinreceptor) felszíni antigéneket a lymphocyták aktiváltsági állapotának meghatározására használtuk.

Statisztikai elemzés

A csoportszintű eredmények statisztikai értékeléséhez Graphpad Prism program segítségével *ismételt mérések 1, illetve 2 paraméteres ANOVA*-t használtunk. Az 1 paraméteres ANOVA-val párhuzamosan elvégeztük a *Bonferroni poszttesztet*, aminek segítségével a vizsgált paraméter heti alakulását tudtuk követni, illetve a *lineáristrend-tesztet* is elvégeztük. A 2 paraméteres ANOVA két paramétere a személyek neve, illetve a kezelés időtartama volt. A szignifikanciaszintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

Eredmények

Neutrophil granulocyták ölképességének mérése

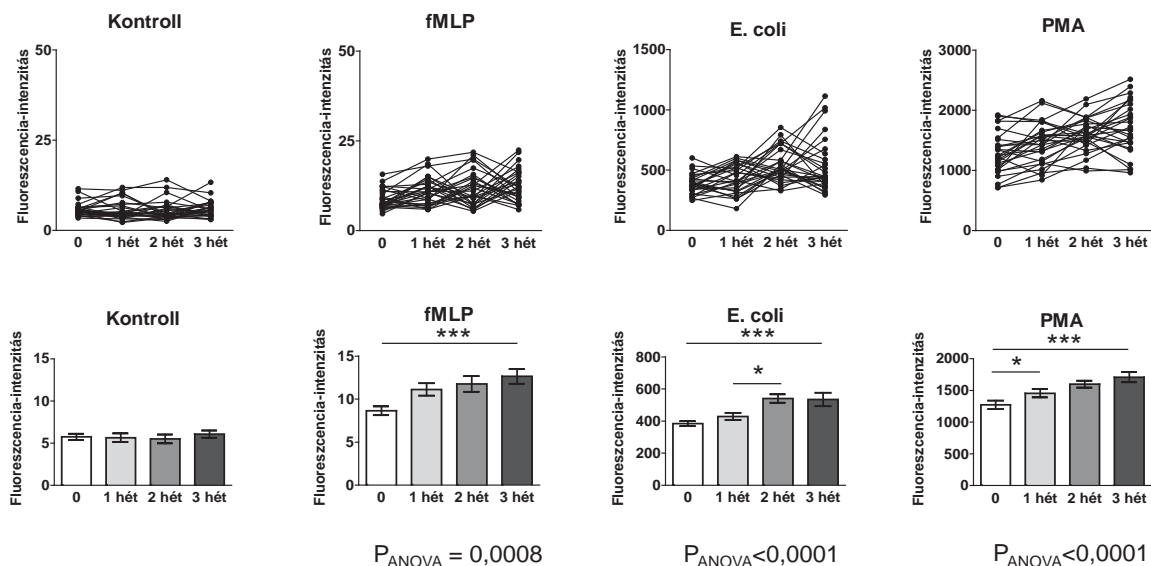
A neutrophil granulocyták reaktív oxigén intermedier (ROI) termelésére vonatkozó egyéni eredményeket, illetve csoportátlagokat a 1. ábra tartalmazza. A neutrophil granulocyták reaktív oxigén intermedier termelése szignifikánsan nőtt a stimulált mintákban. Ezt megerősítette mind az ANOVA- (fMLP: $P = 0,0008$; opszonizált

E. coli: $P < 0,0001$, PMA: $P < 0,0001$), mind a lineáris-trend-vizsgálat. A lineáris trend szerint erősen szignifikáns ($P < 0,0001$) a ROI-termelés emelkedése a harmadik héten a kezelés előtti értékhez viszonyítva mindhárom aktiválószer alkalmazása esetén. Ezenfelül a ROI-termelő sejtek százaléka is szignifikáns mértékben nőtt mind a kontroll-, mind a stimulált minták esetében (2. ábra). Az eredményeket a vizsgált személyek neve nem befolyásolta.

Immunfenotipizálás

A lymphocytá-szubpopulációkon belül az NK-sejtek százalékos megoszlása enyhén, de statisztikailag szignifikáns mértékben ($P = 0,0483$) nőtt az ANOVA alapján, illetve a lineáristrend-teszt alapján is ($P = 0,0056$). Az össz-T-sejtek, a helper T-sejtek, a citotoxikus T-sejtek, az éretlen T-sejtek, illetve a B-lymphocyták százalékos megoszlása nem változott szignifikáns mértékben.

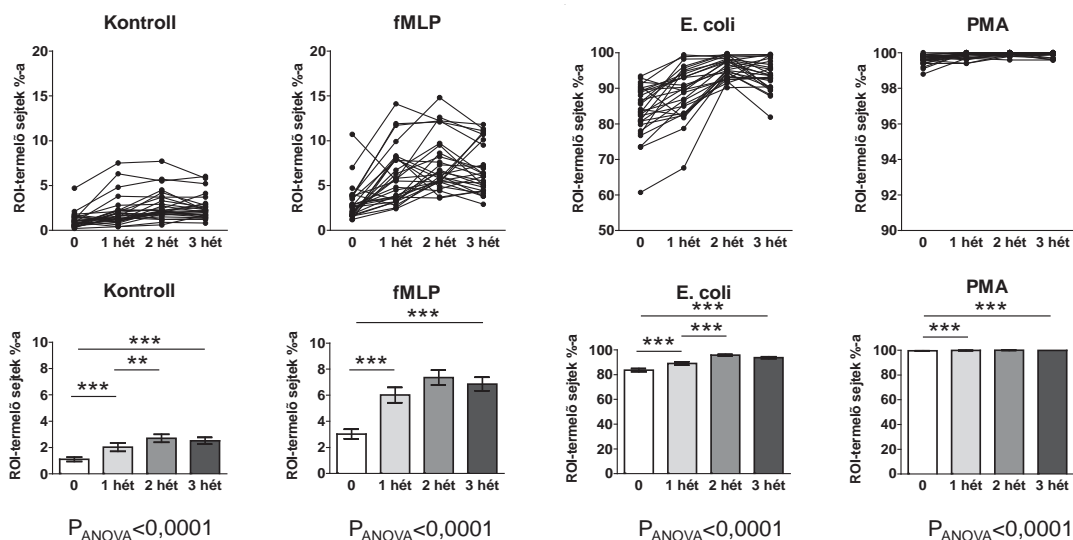
A CD25-aktivációs antigént kifejező T-, illetve helper T-lymphocyták százaléka enyhén, de statisztikailag szignifikáns mértékben nőtt (3. ábra) a Kaqun vízzel végzett kezelés három hete alatt (a lineáristrend-teszt alapján $P = 0,0150$, illetve $P = 0,0415$), bár az ANOVA nem mutatott szignifikáns változást. A transzferrinreceptort hordozó (CD71+) B-lymphocyták százaléka két hét kezelés után csökkent, majd a harmadik hétre az eredeti állapotra állt vissza. A transzferrinreceptort hordozó (CD71+) T-lymphocyták százaléka nem változott a kezelés ideje alatt. A személyek neve nem befolyásolta a mért eredményeket.



Bonferroni-posztteszt:

- *: $P < 0,05$
- ** : $P < 0,01$
- ***: $P < 0,001$

1. ábra Neutrophil granulocyták reaktív oxigén intermedier termelése (oxidatív burst) 3 hét Kaqun vizes kezelés hatására. Felső sor: egyéni eredmények, alsó sor: csoportátlagok \pm SE



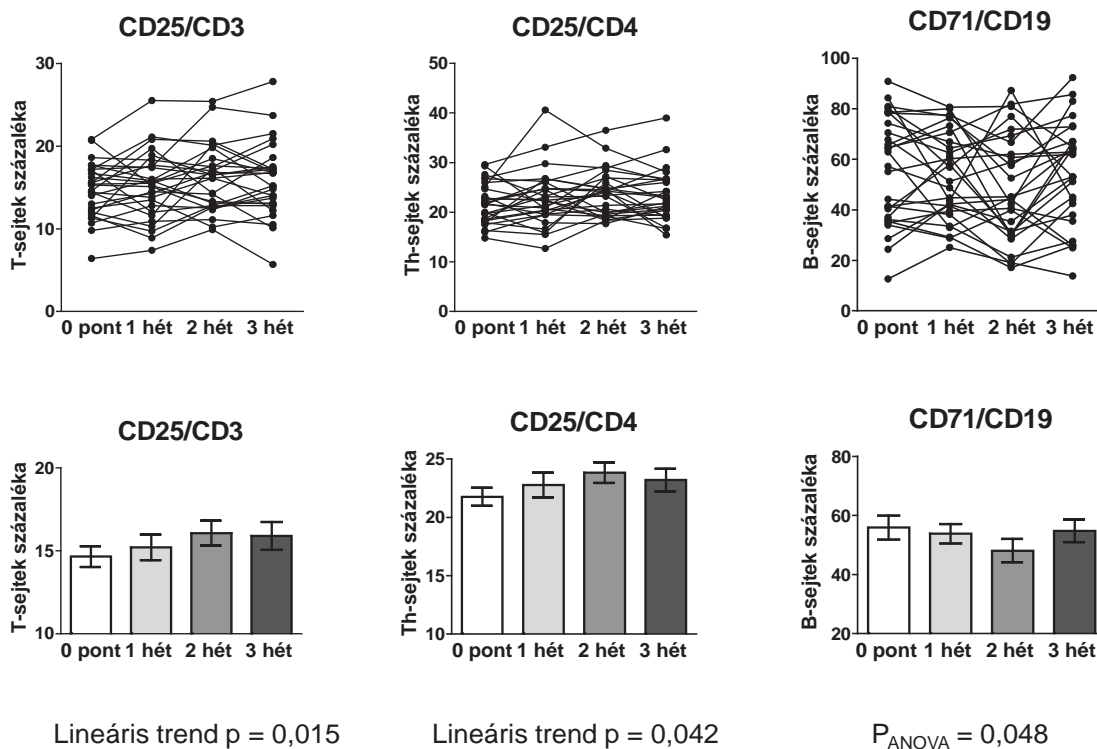
Bonferroni-posztteszt:

*: $P < 0,05$

** : $P < 0,01$

***: $P < 0,001$

2. ábra | Reaktív oxigén intermedier termelő sejtek százalékanak változása 3 hét Kaqun vizes kezelés hatására. Felső sor: egyéni eredmények, alsó sor: csoportátlagok±SE



3. ábra | Aktivációs antigének változása (csoportátlag±SE) 3 hét Kaqun vizes kezelés során. Felső sor: egyéni eredmények, alsó sor: csoportátlagok±SE

Megbeszélés

Vizsgálatunkban a Kaqun víz immunmoduláló hatását mutattuk ki egészséges önkénteseken. A részt vevő személyek 21 napos Kaqun vizes fürdő-, illetve párhuzamos

ivókúrára vettek részt. Eredményeink szerint a Kaqun vízzel történt kezelés a neutrophil granulocyták reaktív oxigén intermedier termelésének, vagyis ölképességének fokozódását okozta. A neutrophil granulocyták fontos szerepet játszanak a gyulladásos folyamatokban, első-

sorban a bakteriális fertőzések elleni védekezésben. Bakteriális és gombás fertőzések során a fehérvérsejtek bekebelezik (fagocitálják) és elpusztítják a kórokozókat. A kórokozók elpusztításában elsősorban a sejtek oxigén jelenlétében működő enzimikus rendszerei (főleg a NADPH-oxidáz) vesznek részt. A fagocitózist kísérő anyagcsere-folyamatok (oxidatív burst) során az aktivált fagocitasejtek antimikrobiális hatású reaktív gyököket termelnek. A NADPH oxidáz enzim komplex a molekuláris oxigént redukálja szuperoxid anionná, amelyből további reaktívoxigén-gyökök keletkeznek [9]. Mind a szuperoxid anion, mind a további gyökök (H₂O₂, hidroxilgyök, hipoklorit) mikroorganizmusok számára erősen toxikus anyagok. A granulocyták oxigéndependens ölképessége, a reaktívoxigén-gyökök termelése függ a környezetben jelen levő oxigén mennyiségétől.

Hohn és munkatársai megállapították, hogy in vitro a neutrophil granulocyták ölképessége *S. aureus* kórokozóval szemben egyenesen arányos az oxigén koncentrációjával. A granulocyták ölképessége oxigén hiányában 37%, 5 Hgmm oxigén jelenlétében 58%, 30 Hgmm oxigén mellett pedig 70% volt [10].

Knighon és munkatársai kimutatták tengerimalacmodellben, hogy megemelt belelegzett oxigén-koncentrációnál (PO₂ 45% a légköri 21%-kal, illetve csökkentett 12%-kal szemben) az intradermalis *E. coli* injekcióval okozott bőrlaesiók száma és mérete csökken, és a fertőzés gátlása specifikus antibiotikum alkalmazásához hasonló mértékű [5].

A Kaqun víz stabil, oldott formában tartalmaz nagy mennyiségű oxigént, amely a bőrön és emésztőrendszeren keresztül a szervezetbe jutva megemeli a szövetekben, így vélhetőleg a vérben is, az oldott oxigén mennyiségét. Eredményeink szerint a Kaqun-kezelés emelkedett ROI-termelést eredményezett a neutrophil granulocytákban a kezelés előtti értékekhez képest, és a stimulált mintákban, illetve a PMA-val stimulált minták esetében a ROI-termelés hétről hétre nőtt. A kontroll, stimulálatlan minták ROI-termelése nem változott. A kontroll, ROI-termelés növekedése, illetve hogy több sejt válaszol a stimulusra, a neutrophil granulocyták ölképességének, baktericid hatásának növekedését eredményezi.

A CD25 sejtfelszíni molekula expressziójának növekedése a T-lymphocyták aktivációjára utal. Eredményeink szerint a T-lymphocyták, illetve ezen belül a helper T-sejtek aktivációja (a CD25 expressziója) fokozódott a Kaqun vízzel történt kezelés során.

Hyperbaricus oxigénterápia immunmoduláló hatását vizsgálva egészséges önkénteseken *Ginaldi és munkatársai* [11] kimutatták, hogy nő az aktivált, CD25-, illetve HLA-DR-pozitív citotoxikus T-sejtek százaléka a kezelés hatására. A saját eredményeinkhez hasonlóan vizsgálataik során a T-sejt-alpopulációkban nem találtak változást. A Kaqun-terápia viszont egy másik lymphocytá-alpopulációban, az NK-sejtek százalékában okozott enyhe, de szignifikáns emelkedést.

Összefoglalásul: A Kaqun-terápia által a szervezetben megemelkedett oldott oxigén-koncentráció számos im-

munológiai funkcióra hatással van: a neutrophil granulocyták ölképességének fokozódását, a T-lymphocyták aktivációját, vagyis az immunválasz aktivitásának növekedését okozza, és növeli az NK-sejtek előfordulását, ami a vírussal fertőzött vagy tumoros sejtek elpusztítását segítheti elő.

Anyagi támogatás: A vizsgálat a Kaqun Hungária Kft. anyagi támogatásában részesült.

Szerzői munkamegosztás: B. A.: A vizsgálat lefolytatása, statisztikai elemzések, kézirat megszüvegezése; T. A.: A vizsgálat orvosi felügyelete. A cikk végleges változatát mindkét szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] *Al-Waili, N. S., Butler, G. J., Beale, J. et al.*: Hyperbaric oxygen and malignancies: a potential role in radiotherapy, chemotherapy, tumor surgery and phototherapy. *Med. Sci. Monit.*, 2005, 11(9), RA279–RA289.
- [2] *Tóth, J.*: The effect of oxygenation on the biological behaviour of tumours. [Az oxigenizáció hatása a daganatok biológiai viselkedésére.] *Orv. Hetil.*, 2007, 148(30), 1415–1420. [Hungarian]
- [3] *Feldmeier, J. J., Hampson, N. B.*: A systematic review of the literature reporting the application of hyperbaric oxygen prevention and treatment of delayed radiation injuries: an evidence based approach. *Undersea Hyperb. Med.*, 2002, 29(1), 4–30.
- [4] *Thackham, J. A., McElwain, D. L., Long, R. J.*: The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen.*, 2008, 16(3), 321–330.
- [5] *Knighon, D. R., Halliday, B., Hunt, T. K.*: Oxygen as an antibiotic: the effect of inspired oxygen on infection. *Arch. Surg.*, 1984, 119(2), 199–204.
- [6] *Malomsoki, J.*: Effect of oxyhydromassage therapy on some physiological parameters. [Az oxihidromasszázs-kezelés egyes élettani hatásai.] *Orv. Hetil.*, 2009, 150(4), 161–164. [Hungarian]
- [7] *Biró, A., Pállinger, É., Major, J., et al.*: Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol. Lett.*, 2002, 81(2), 133–140.
- [8] *Biró, A., Fodor, Z., Major, J., et al.*: Immunotoxicity monitoring of hospital staff occupationally exposed to cytostatic drugs. *Pathol. Oncol. Res.*, 2011, 17(2), 301–308.
- [9] *Babior, B. M.*: NADPH Oxidase: An update. *Blood*, 1999, 93(5), 1464–1476.
- [10] *Hohn, D. C., MacKay, R. D., Halliday, B., et al.*: Effect of O₂ tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro. *Surg. Forum*, 1976, 27(62), 18–20.
- [11] *Ginaldi, L., Pilotti, L., Sacchetti, S., et al.*: Modification of immune parameters after hyperbaric oxygen treatment in healthy volunteers: preliminary data. *J. Hyperbaric Med.*, 1991, 6(1), 19–24.; 25–31.

(Biró Anna dr.,
Budapest, Nagyvárad tér 2., 1096
e-mail: biro.anna@okbi.antsz.hu)