

# Wasserstoff wirkt als therapeutisches Antioxidans durch selektive Reduktion zellschädigender Sauerstoff-Radikale

Ikuroh Ohsawa<sup>1</sup>, Masahiro Ishikawa<sup>1</sup>, Kumiko Takahashi<sup>1</sup>, Megumi Watanabe<sup>1,2</sup>, Kiyomi Nishimaki<sup>1</sup>, Kumi Yamagata<sup>1</sup>, Ken-ichiro Katsura<sup>2</sup>, Yasuo Katayama<sup>2</sup>, Sadamitsu Asoh<sup>1</sup> & Shigeo Ohta<sup>1</sup>

**Akuter oxidativer Stress, der durch Ischämie bzw. Reperfusion (verminderte Blutversorgung bzw. Wiederdurchblutung) oder Entzündungen hervorgerufen wird, verursacht schwere Gewebeschäden, und anhaltender oxidativer Stress gilt als eine der Ursachen für eine große Zahl häufiger Krankheiten einschließlich Krebs. Wir zeigen hier auf, dass Wasserstoff (H<sub>2</sub>) das Potenzial hat, als Antioxidans in präventiven und therapeutischen Anwendungen zu wirken. Wir induzierten (induzieren: auslösen, herbeiführen) akuten oxidativen Stress in kultivierten Zellen durch drei verschiedene voneinander unabhängige Methoden. H<sub>2</sub> reduzierte selektiv das Hydroxyl-Radikal (•OH), das am stärksten zellschädigend wirkende reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und sorgte für einen effektiven Zellschutz. H<sub>2</sub> reagierte jedoch nicht mit anderen ROS, die physiologisch wichtige Funktionen aufweisen. Im Tiermodell benutzten wir Ratten, bei denen im Hirn durch eine fokale zerebrale Ischämie (verminderte Hirndurchblutung) und Reperfusion Schäden durch oxidativen Stress verursacht wurden. Die Inhalation von Wasserstoff-Gas führte zu einer deutlichen Minderung von Hirnschäden durch Abpufferung der Auswirkungen oxidativen Stresses. Somit kann Wasserstoff als effektives Antioxidans in der Therapie eingesetzt werden. Durch seine Fähigkeit, schnell durch Zellmembranen hindurchzudiffundieren, kann Wasserstoff mit zellschädigenden ROS in Kontakt kommen, sie neutralisieren und einen Schutz vor oxidativer Gewebeschädigung bilden.**

Oxidativer Stress entsteht durch das starke zelluläre Oxidationspotenzial überschüssiger reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bzw. freier Radikale<sup>1-5</sup> (Quellenangaben hochgestellt). Der größte Anteil von Superoxid-Anion-Radikalen (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) wird in den Mitochondrien durch Austritt von Elektronen aus der Elektronentransportkette und den Citrat-Zyklus (ein Kreislauf biochemischer Reaktionen, der eine wichtige Rolle im Stoffwechsel (Metabolismus) aerober (O<sub>2</sub> benötigender) Zellen von Lebewesen spielt) erzeugt<sup>6</sup>. O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> wird auch durch Enzymsysteme wie Oxidasen, einschließlich NADPH-Oxidase und Xanthin-Oxidase, erzeugt<sup>7</sup>. Superoxid-Dismutase wandelt O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> in Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) um<sup>8</sup>, das entweder durch Glutathionperoxidase oder Katalase zu Wasser umgewandelt und somit detoxifiziert wird. Überschüssige O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> reduzieren Übergangsmetallionen wie etwa Fe<sup>3+</sup> und Cu<sup>2+</sup> (siehe Quellenangabe 2), deren reduzierte Formen ihrerseits mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren können, um Hydroxyl-Radikale (•OH) durch die Fenton-Reaktion (Bildung von Hydroxyl-Radikalen bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid durch Eisen(II)): Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Fe<sup>3+</sup> + •OH + •OH) zu bilden. •OH ist das stärkste unter den reaktiven Sauerstoffspezies und reagiert unterschiedslos mit Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen. Es ist kein Detoxifikationssystem für •OH bekannt; deshalb ist das Abfangen bzw. Neutralisieren von •OH ein wichtiger antioxidativer Prozess<sup>9</sup>.

Trotz ihrer zellschädigenden Wirkungen spielen O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei niedrigen Konzentrationen physiologisch wichtige Rollen: Sie fungieren als regulatorische Signalmoleküle, die bei zahlreichen Signalübertragungskaskaden beteiligt sind. Sie regulieren auch biologische Prozesse wie etwa Apoptose (Zelltod), Zellwucherungen und -differenzierungen<sup>7, 10</sup>. Bei höheren Konzentrationen wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch das Enzym Myeloperoxidase in Hypochlorsäure (HOCl) umgewandelt; Hypochlorsäure wirkt antibakteriell<sup>5</sup>. Das Stickoxid-Radikal (NO•), ein weiteres ROS, fungiert als Neurotransmitter und ist von wesentlicher Bedeutung für die Erweiterung der Blutgefäße<sup>11</sup>. Zellschädigende Radikale wie etwa •OH müssen also neutralisiert werden, ohne die wichtigen biologischen Aktivitäten anderer physiologisch wichtiger ROS zu beeinträchtigen. Wir zeigen hier auf, dass molekularer Wasserstoff (H<sub>2</sub>) die durch •OH herbeigeführten Zellschädigungen beheben kann, ohne die anderen physiologisch wichtigen ROS zu beeinträchtigen, und stellen zur Diskussion, dass H<sub>2</sub> das Potenzial aufweist, als Antioxidans für präventive und therapeutische Anwendungen zu fungieren.

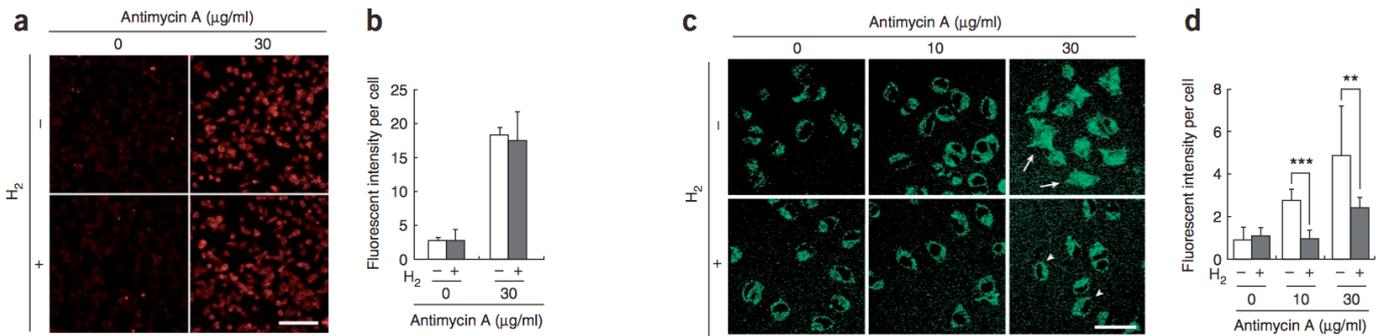
## ERGEBNISSE

### H<sub>2</sub> reduziert selektiv das Hydroxyl-Radikal (•OH) in kultivierten Zellen

H<sub>2</sub> reduziert das •OH, das durch Radiolyse (Spaltung chemischer Bindungen unter Einwirkung ionisierender Strahlung) oder Photolyse (Spaltung eines Moleküls ausgelöst durch die Bestrahlung mit Licht) von Wasser erzeugt wird<sup>12</sup>. Ob jedoch H<sub>2</sub> das •OH in lebendigen Zellen effektiv neutralisieren kann, wurde bisher nicht direkt untersucht. Da die durch spontane Erzeugung von •OH hervorgerufene Zellschädigung nicht stark genug ist, um feststellbar und somit messbar zu sein, lösten wir die Erzeugung von •OH (bzw. oxidativem Stress) in kultivierten PC12-Zellen (Tumorzelllinien von Ratten) aus. Dazu behandelten wir die Zellen mit einem mitochondrialen Atmungskettenkomplex III-Inhibitor, Antimycin A (ein Antibiotikum und Hemmstoff des Komplex III der Atmungskette<sup>13</sup>). Nach dieser Behandlung wandelte sich das •OH in diesen Zellen schnell in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um. Die Hinzufügung von Antimycin A erhöhte die Konzentrationen an O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gemessen an den Fluoreszenz-Signalen, die jeweils von den oxidierten Formen von MitoSOX (**Abb. 1a**) und 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (Fluoreszenzfarbstoff DCFH, **Zusatz-Abb. 1**) abgegeben wurden. Wir lösten H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben im Medium und hielten über 24 Stunden die Konzentration von H<sub>2</sub> aufrecht (**Zusatz-Abb. 2**). Das im Kulturmedium gelöste H<sub>2</sub> verringerte nicht die MitoSOX- und DCFH-Signale in den Zellen (**Abb. 1a,b** und **Zusatz-Abb. 1**). H<sub>2</sub> verringerte auch nicht die Gleichgewichtskonzentration von NO• (**Zusatz-Abb. 1**). Im Gegensatz dazu verringerte die Behandlung mit H<sub>2</sub> signifikant die Konzentration von •OH, gemessen an den Fluoreszenz-Signalen, die von der oxidierten Form von 2-[6-(4'-Hydroxy)Phenoxy-3H-Xanthen-3-on-9-yl]-Benzoat (HPF bzw. „HPF-Signal“) abgegeben wurden<sup>14,15</sup> (**Abb. 1c,d**). Als wir die Zellen unter Abwesenheit von H<sub>2</sub> dem Antimycin A aussetzten (30 µg/ml), verstärkten sich die HPF-Signale sowohl in der Region um den Zellkern als auch im Zytoplasma (gesamter Zellinhalt), und zwar vermutlich, weil H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus den Mitochondrien diffundierte, um •OH zu bilden. Auffallend dabei war, dass H<sub>2</sub> die Konzentration an •OH in der Region um den Zellkern verringerte (**Abb. 1c**).

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, 1-396 Kosugi-cho, Nakahara-ku, Kawasaki City 211-8533, Japan. <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan. Bitte richten Sie Ihren Schriftverkehr an S.O. (ohta@nms.ac.jp).

Erhalten am 25. September 2006; angenommen am 15. März 2007; online veröffentlicht am 7. Mai 2007; doi:10.1038/nm1577

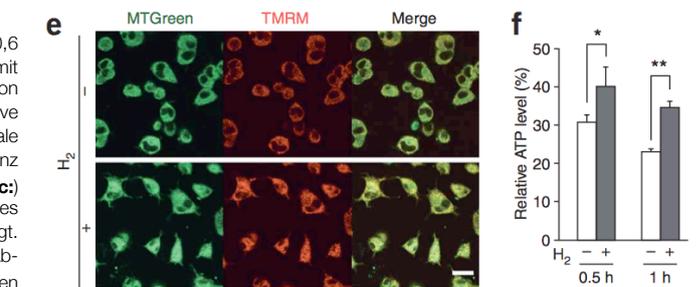


**Abb. 1:** Im Medium gelöster molekularer Wasserstoff reduziert selektiv Hydroxyl-Radikale in kultivierten Zellen. **(a,b):** PC12-Zellen wurden im Medium mit bzw. ohne 0,6 mM H<sub>2</sub> inkubiert (hier: mit Wasserstoff-Gas behandelt; sonst: bebrütet, vermehrt) und mit dem Antibiotikum Antimycin A (30 μg/ml für 30 min.) behandelt, um die Produktion von O<sub>2</sub><sup>•</sup> auszulösen. Danach erfolgte eine Behandlung mit 0,5 μM MitoSOX. Repräsentative Fluoreszenz-Abbildungen von mit MitoSOX behandelten Zellen wurden durch konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (mit dem Olympus FV300) erhalten. Die MitoSOX-Fluoreszenz wurde aus 100 Zellen bei jedem eigenständigen Experiment quantifiziert (n = 5). **(c):** Repräsentative konfokale Laser-Raster-Mikroskopieaufnahmen der Fluoreszenz des •OH-Markers HPF wurden 30 Minuten nach der Zugabe von Antimycin A angefertigt. Pfeile und Pfeilspitzen (Darstellungen rechts) weisen jeweils auf die Zunahme bzw. Abnahme der HPF-Signale in der Region um den Zellkern hin. **(d):** HPF-Fluoreszenz in den mit Antimycin A behandelten Zellen mit bzw. ohne 0,6 mM H<sub>2</sub> wurde aus 100 Zellen quantifiziert (n = 4). \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001. **(e):** 30 Minuten nach Zugabe von Antimycin A (10 μg/ml) mit bzw. ohne H<sub>2</sub> (0,6 mM) wurden die Zellen für eine Zeitdauer von 10 Minuten mit 1 μM MitoTracker Green („MTGreen“) und 100 nM Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) inkubiert und dann fotografiert. Die beiden Bilder wurden dann überlagert („Merge“) bzw. zusammengefügt. **(f):** Zellen wurden mit 4,5 g/l 2-Deoxy-D-Glucose (einem Glycolyse-Inhibitor, Hemmer der Zuckerspaltung von Glucose) und 1 mM Pyruvat vorbehandelt, und die relativen zellulären ATP-Konzentrationen wurden nach Zugabe von 30 μg/ml Antimycin A quantifiziert. Die ATP-Konzentrationen von Zellen, die nicht mit Antimycin A behandelt wurden, wurden auf 100% festgesetzt (n = 3). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. Maßstabsbalken (jeweils unten rechts, weiß): 100 μm in **a**; 50 μm in **c**; 20 μm in **e**. Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittlichen Standardabweichungen („mean ± SD“).

Nach der Behandlung mit Antimycin A verhinderte H<sub>2</sub> die Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials, gemessen an der Fluoreszenz von Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM), die vom mitochondrialen Membranpotenzial abhängig ist, wohingegen die Fluoreszenz-Signalstärken von MitoTracker Green (MTGreen), die unabhängig vom Membranpotenzial sind, unverändert blieben (**Abb. 1e**). Dies wies darauf hin, dass H<sub>2</sub> einen effektiven Schutz der Mitochondrien gegen •OH bildet. Mit H<sub>2</sub> behandelte Zellen hatten ein normales Aussehen, wohingegen nicht mit H<sub>2</sub> behandelte Zellen geschrumpft waren und abnormale runde Formen aufwiesen (**Abb. 1e**). Einhergehend mit dieser Schutzwirkung verhinderte H<sub>2</sub> auch eine Abnahme der zellulären Konzentrationen an in den Mitochondrien erzeugtem ATP (**Abb. 1f**). Die Tatsache, dass H<sub>2</sub> eine schützende Wirkung auf Mitochondrien und Zellkern-DNA ausübte, lieferte den Beweis dafür, dass H<sub>2</sub> die meisten Zellmembranen passierte und in die Organellen (funktionelle Systeme in einer Zelle, die von einer Lipidmembran umschlossen sind) diffundierte.

### Im Medium gelöstes H<sub>2</sub> schützt kultivierte Zellen vor Hydroxyl-Radikalen (•OH)

Wir platzierten PC12-Zellen in einem Kulturmedium, das H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> enthielt, und lösten gleichzeitig durch Hinzufügung von Antimycin A oxidativen Stress aus. 24 Stunden nach Einleitung der ROS mit Antimycin A beobachteten wir, dass H<sub>2</sub> die Zellkern-DNA vor Oxidation zu schützen schien, wie sich an den niedrigeren Konzentrationen oxidierten Guanins (8-OH-G) zeigte<sup>16</sup> (**Abb. 2a,b**). H<sub>2</sub> verringerte auch die Konzentration von 4-Hydroxyl-2-Nonenal (HNE), einem Endprodukt der Lipidperoxidation<sup>17</sup> (**Abb. 2c,d**), was darauf hinweist, dass H<sub>2</sub> Lipide vor Peroxidation schützt. Zusätzlich schützte das im Medium gelöste H<sub>2</sub> Zellen vor dem Zelltod, abhängig von der Dosierung (**Abb. 2e,f**). Als wir dem zuvor mit H<sub>2</sub> gesättigtem Medium das H<sub>2</sub> entzogen, war der Schutzeffekt nicht mehr vorhanden (**Abb. 2f**), was darauf hinweist, dass der beobachtete Effekt nicht auf eine Reaktion des H<sub>2</sub> mit dem Medium zurückzuführen war. Ebenso konnten wir nachweisen, dass H<sub>2</sub> die Zellviabilität (Vitalität und Lebensfähigkeit der Zelle) schützte, wozu wir zwei methodische Ansätze wählten: einen modifizierten MTT-Test (WST-1-Test, Test zur Bestimmung der Zellviabilität) und eine Messung der Entweichung bzw. Leckage zellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) aus beschädigten Zellen (**Zusatz-Abb. 3**). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Schutzeffekt des H<sub>2</sub> auf eine Reaktion mit Antimycin A zurückzuführen war, induzierten wir ROS durch Hinzufügung von Menadion (Vitamin K 3), einem Inhibitor

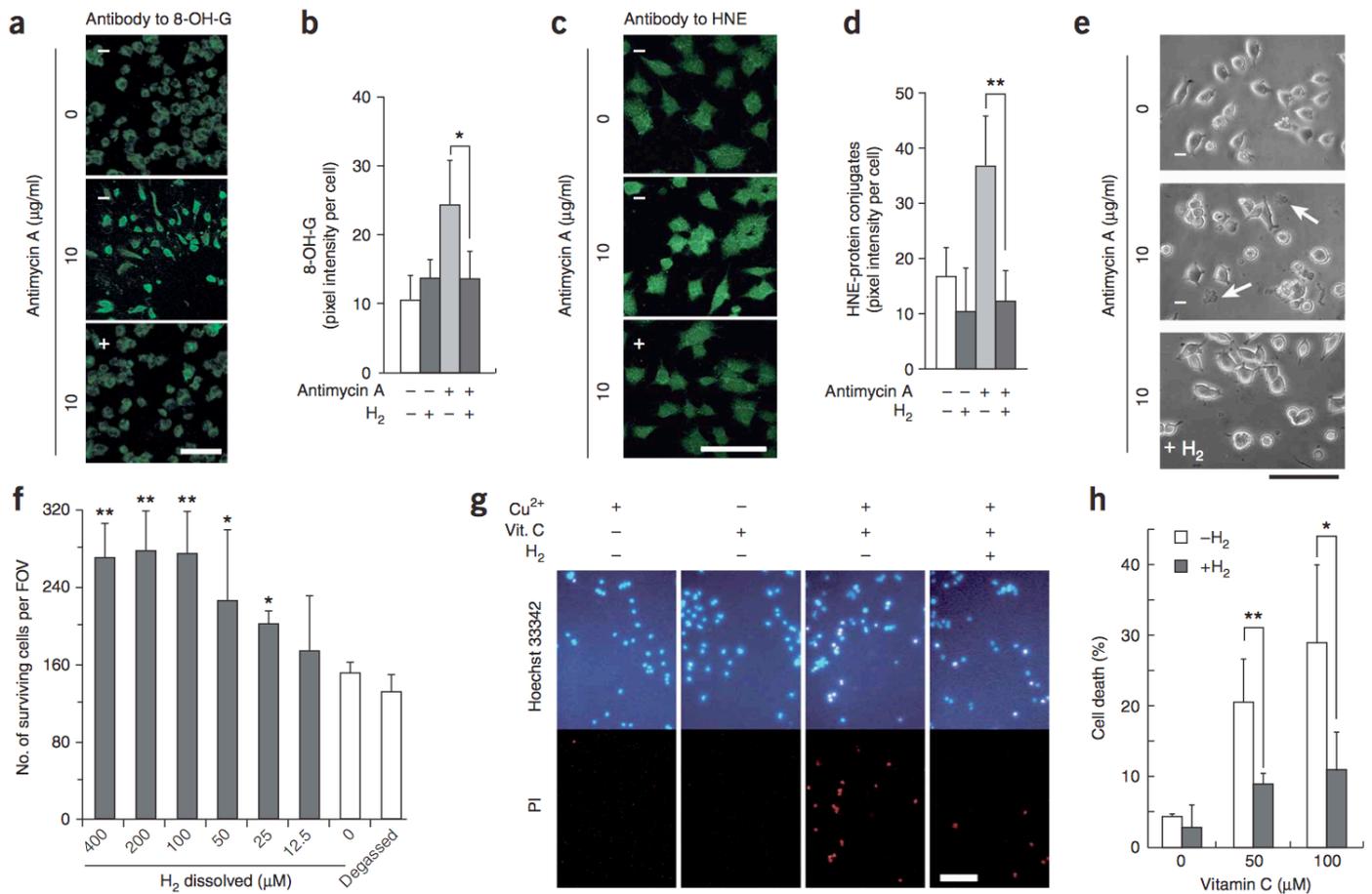


(Hemmer), der auf den mitochondrialen Komplex I (ein Verbund von 40 Proteinen in der inneren Membran der Mitochondrien) einwirkt, und konnten beobachten, dass H<sub>2</sub> auch in diesem System eine Schutzwirkung auf die Zellen ausübte (Zusatz-Abb. 3). Um zu überprüfen, ob H<sub>2</sub> eine oxidative Schutzwirkung vor •OH ausübt, behandelten wir die Zellen zunächst mit Cu<sup>2+</sup> und setzten sie dann einer Ascorbatlösung aus, um das intrazelluläre Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> zu reduzieren, welches dann seinerseits die Produktion von •OH aus zellulärem, endogen produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert (anregt). Diese Behandlung induzierte in erster Linie •OH innerhalb der Zellen (durch die Fenton-Reaktion), womit direkt nachgewiesen werden konnte, dass H<sub>2</sub> eine Schutzwirkung gegen zelluläre •OH ausübt (**Abb. 2g,h**).

### „Spin-Trapping“ erkennt und identifiziert ein freies Radikal, das durch H<sub>2</sub> reduziert wird

Um die freien Radikalspezies zu bestimmen, die H<sub>2</sub> reduziert, studierten wir die Auswirkungen von H<sub>2</sub> auf Elektronenspinresonanz- (ESR) Signale von sog. „Spin-Trapping-Reagenzien“ (Spinfallen-Reagenzien zur Erkennung und Identifizierung kurzlebiger Radikale). Dazu produzierten wir •OH durch die zelluläre Fenton-Reaktion und semiquantifizierten die zellulären Konzentrationen von •OH durch Spin-Trapping unter Verwendung von 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO). Die ESR-Messungen wiesen darauf hin, dass die H<sub>2</sub>-Behandlung tatsächlich zu einer Verringerung der Signale von •DMPO-OH, abgeleitet von •OH, führten (**Abb. 3a-c**).

Als wir außerdem die Produktion von O<sub>2</sub><sup>•</sup> durch Behandlung von Zellen mit Antimycin A in Anwesenheit von DMPO induzierten, konnten wir multiple ESR-Signale beobachten<sup>18</sup>. Diese Signale schienen sich aus jenen der •DMPO-OH- und •DMPO-H-Radikale zusammensetzen (**Abb. 3d-f**). Das •DMPO-H-Radikal wird vom Wasserstoff-Radikal (H) abgeleitet, das durch Porphyrine (organisch-chemische Farbstoffe) induziert werden kann. Um die Signalveränderungen durch H<sub>2</sub> zu visualisieren, nahmen wir eine Differenzspektroskopie vor (Messmethode, bei der eine Strahlung nach einer bestimmten Eigenschaft wie Energie, Wellenlänge, Masse, Absorptionsdifferenzen, etc. zerlegt wird). Dabei stellten wir fest, dass nur von •OH abgeleitete Signale eine Verringerung durch die H<sub>2</sub>-Behandlung erfuhren (**Abb. 3e**). Diese Ergebnisse weisen deutlich auf die selektive Reduktion von zellulären •OH durch die H<sub>2</sub>-Behandlung hin.



**Abb. 2:** Molekularer Wasserstoff schützt kultivierte PC12-Zellen durch Abfangen bzw. Neutralisieren von Hydroxyl-Radikalen. **(a–d)** PC12-Zellen wurden mit 10 µg/ml Antimycin A, mit (+) bzw. ohne (–) 0,6 mM H<sub>2</sub>, für 24 Stunden in einem geschlossenen Kolben inkubiert und immungefärbt mit Antikörpern zu 8-OH-G oder HNE. Die Fluoreszenz-Signale als Reaktion auf 8-OH-G und HNE wurden quantifiziert, indem 100 Zellen bei jedem eigenständigen Experiment verwendet wurden (n = 4). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. **(e)** Phasenkontrastaufnahmen der PC12-Zellen 24 Stunden nach der Behandlung mit Antimycin A, mit (+) bzw. ohne (–) 0,6 mM H<sub>2</sub>. Die Pfeile weisen auf die toten Zellen hin. **(f)** Die Konzentration überlebender Zellen wurde durch manuelles Zählen der Zellen bestimmt (siehe „Methoden“; n = 4). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 (verglichen mit 0 µM H<sub>2</sub>). **(g)** PC12-Zellen wurden intrazellulären •OH ausgesetzt, die durch die Fenton-Reaktion produziert wurden, und mit bzw. ohne 0,6 mM H<sub>2</sub> behandelt. Die Zellen wurden mit 1 mM CuSO<sub>4</sub> inkubiert, gewaschen und für eine Stunde 0,1 mM Ascorbat (Vit. C) ausgesetzt, um intrazelluläres Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> zu reduzieren (siehe „Ergänzende Methoden“). Die Zellen wurden mit Propidiumjodid (PI, für tote Zellen) und Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. **(h)** Die Konzentration überlebender Zellen wurde wie unter **f** durch manuelles Zählen der Zellen (n = 5) bestimmt. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. Maßstabsbalken: 50 µm in **a,c,e**; 100 µm in **g**. Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittlichen Standardabweichungen.

### H<sub>2</sub> reduziert selektiv Hydroxyl-Radikale (•OH) und Peroxynitrit (ONOO•) in zellfreien Systemen

Als nächstes konnten wir in einer reinen Lösung nachweisen, dass das HPF-Fluoreszenz-Signal verwendet werden kann, um die Reduktion von •OH durch H<sub>2</sub> während der anhaltenden •OH-Produktion mittels der Fenton-Reaktion zu überwachen. Unter diesen Umständen verhinderte H<sub>2</sub> Erhöhungen der HPF-Signale dosisabhängig (**Abb. 4a–c**). Doch als wir die Mischung einer Lösung anfertigten, die H<sub>2</sub> mit HPF enthielt, das mit •OH voroxidiert war, gab es keine Verringerung der Fluoreszenz-Signale von oxidierten HPF (Daten hier nicht gezeigt), was dafür spricht, dass H<sub>2</sub> direkt mit •OH reagiert.

Als nächstes untersuchten wir das Reaktionsvermögen von H<sub>2</sub> mit anderen ROS oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS). Wir fertigten eine Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Peroxynitrit (ONOO•) durch Verdünnung der jeweiligen Stammlösungen an, sowie O<sub>2</sub>• durch die Enzymreaktion von Xanthin-Oxidase mit Xanthin, und NO• durch die spontane Reaktion von 1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazin (NOC7) in zellfreien Systemen (siehe „Ergänzende Methoden“). H<sub>2</sub> reduzierte ONOO• (**Abb. 4d**) geringfügig, doch es gab keine Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO• und O<sub>2</sub>• (**Abb. 4e–g**). In zellfreien Experimenten untersuchten wir, ob H<sub>2</sub> die oxidierten Formen von Biomolekülen reduziert, die bei metabolischen Oxidation-Reduktions-Reaktionen beteiligt sind. Bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert reduzierten mit H<sub>2</sub> gesättigte Lösungen nicht die oxidierten Formen der Coenzyme Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) oder die oxidierte Form des Proteins Cytochrom c (Daten nicht gezeigt). Daraus leiten wir ab, dass H<sub>2</sub> keinen Einfluss auf den Metabolismus ausübt, der bei Oxidation-Reduktions-Reaktionen

beteiligt ist, ebenso wenig wie auf die Konzentrationen von O<sub>2</sub>•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NO•, die allesamt wichtige Rollen bei der Signalübertragung spielen.

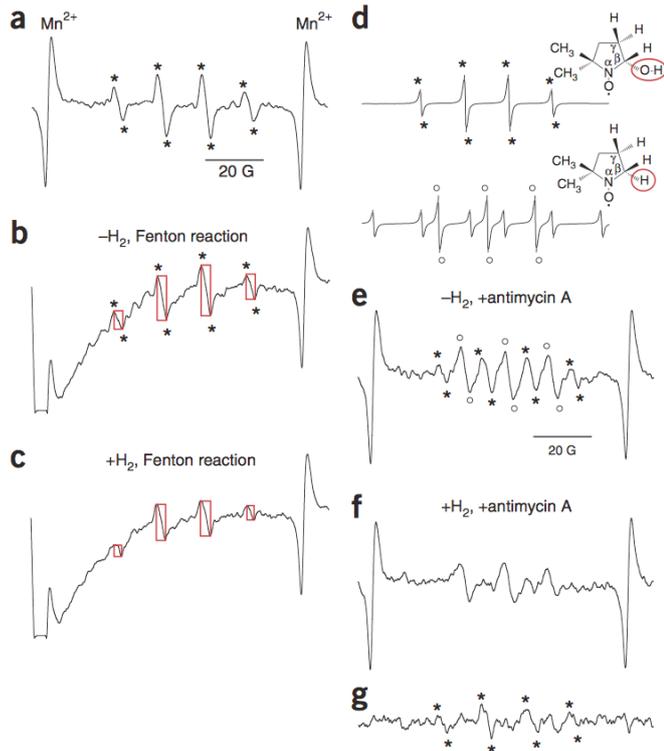
### H<sub>2</sub> schützt Neuronen vor in-vitro-Ischämie und Reperfusion

Wir induzierten auch oxidativen Stress in einer Primärkultur mit neokortikalen Zellen (Zellen der Großhirnrinde)<sup>19</sup> unter stärker ausgeprägten physiologischen Bedingungen. Es ist allgemein bekannt, dass ein schneller Übergang von einem ischämischen Zustand zu einem der Wiederherstellung der Blutversorgung (Reperfusion) in Schädigungen durch oxidativen Stress resultiert<sup>20</sup>. Zur Nachahmung der Ischämie setzten wir neokortikale Zellen für 60 Minuten einem Sauerstoff-Glucose-Entzug (Oxygen Glucose Deprivation, OGD) unter Stickstoff- bzw. Wasserstoff-Gas aus, gefolgt von einer Reperfusion mit einem Medium, das O<sub>2</sub> und Glucose enthält.

Die HPF-Fluoreszenz-Signale zeigten, dass 10 Minuten nach Ende des OGD-Prozesses und der nachfolgenden Reperfusion die Konzentrationen von •OH deutlich erhöht waren, wenn H<sub>2</sub> abwesend war, sich jedoch bei Anwesenheit von H<sub>2</sub> signifikant verringerten (**Zusatz-Abb. 4**). 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion erhöhte H<sub>2</sub> die (Über)lebenskraft der Neuronen (**Zusatz-Abb. 4**), was darauf hinweist, dass H<sub>2</sub> die Neuronen effektiv vor durch oxidativen Stress induzierten Zelltod schützt.

### Inhalation von H<sub>2</sub>-Gas schützt vor Hirnschädigung durch Reperfusion

Um die therapeutische Anwendbarkeit von H<sub>2</sub> als ein Antioxidans zu untersuchen, verwendeten wir ein Tiermodell, mit dem bei Ratten eine künstliche Ischämie induziert wurde. Während der zerebralen Ischämie und Reperfusion werden ROS produziert, die eine der Hauptursachen für Hirnschädigungen sind<sup>21,22</sup>. Im Tiermodell induzierten wir eine fokale zerebrale Ischämie bei Ratten durch Okklusion (Verschluss) der mittleren Zerebralarterie (Hirnarterie,



**Abb. 3:** „Spin-Trapping“ erkennt und identifiziert die freien Radikale, die durch  $H_2$  reduziert werden. **(a):** Standard-Elektronenspinresonanz- (ESR)-Signale des  $\cdot DMPOOH$ -Radikals wurden durch Einfangen von  $\cdot OH$  mit einem Spinfallen-Reagenz (DMPO; Details im Abschnitt „Ergänzende Methoden“) bezogen. **(b,c):** PC12-Zellen wurden für 30 Minuten bei einer Temperatur von  $37^\circ C$  mit  $0,1 M$  DMPO und  $2 mM$   $CuSO_4$  und mit bzw. ohne  $0,6 mM$   $H_2$  präinkubiert. Nach Entfernung dieses Mediums wurden die Zellen für 5 Minuten bei einer Temperatur von  $23^\circ C$  mit  $0,2 mM$  Ascorbat und  $0,1 mM$   $H_2O_2$  behandelt, um  $\cdot OH$  zu produzieren, und dann zur Messung der ESR-Signale in eine flache Küvette gegeben. Die Höhe der roten Rechtecke reflektiert die Intensität des Signals. **(d):** Die  $\cdot DMPO-OH$ - und  $\cdot DMPO-H$ -Radikale<sup>18</sup> und ihre korrespondierenden ESR-Signale werden hier veranschaulicht. **(e,f):** PC12-Zellen wurden für 7 Minuten bei einer Temperatur von  $23^\circ C$  in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) inkubiert, die  $0,1 M$  DMPO und  $30 \mu g/ml$  Antimycin mit bzw. ohne  $0,6 mM$   $H_2$  enthält, und dann zur Messung des ESR-Signals in eine flache Küvette gegeben. **(g):** Ein Differenzspektrum wurde durch Subtraktion des Spektrums in **f** von dem in **e** bezogen, um die durch die Behandlung mit  $H_2$  verringerten Signalstärken zu visualisieren. Die mit (\*) versehenen Spitzenwerte weisen auf  $\cdot DMPO-OH$ -Signale hin, die von  $\cdot OH$  abgeleitet wurden. Die mit (o) versehenen Spitzenwerte weisen jeweils auf  $\cdot DMPO-OH$ - und  $\cdot DMPO-H$ -Signale hin **(a, b, d, e und g)**.

stellten eine deutliche Abnahme des Infarkt Volumens in Abhängigkeit der Menge an  $H_2$  fest, wobei eine Konzentration von 2 bis 4%  $H_2$  die deutlichsten Effekte hervorbrachte **(Abb. 5c)**. Wir konnten auch beobachten, dass  $H_2$  seine Effekte nur hervorbrachte, wenn das Gasgemisch während der Reperfusion-Phase inhaliert wurde; wurde  $H_2$  während der Ischämie-Phase inhaliert, gab es keine signifikante Abnahme des Infarkt Volumens **(Abb. 5d,e)**. Zum Vergleich prüften wir zwei weitere Verbindungen: Edaravon (Wirkstoff zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen des motorischen Nervensystems, in Japan als ROS-Fänger zur Behandlung von Hirninfarkten zugelassen<sup>25</sup>) und FK506 (in den USA in klinischen Studien zur Behandlung von Hirninfarkten eingesetzt<sup>26</sup>).  $H_2$  zeigte bei der Linderung oxidativer Schäden eine höhere Effektivität als Edaravon und die gleiche Effektivität wie FK506 **(Abb. 5c)**. Diese Resultate weisen auf das therapeutische Potenzial von  $H_2$  hin.

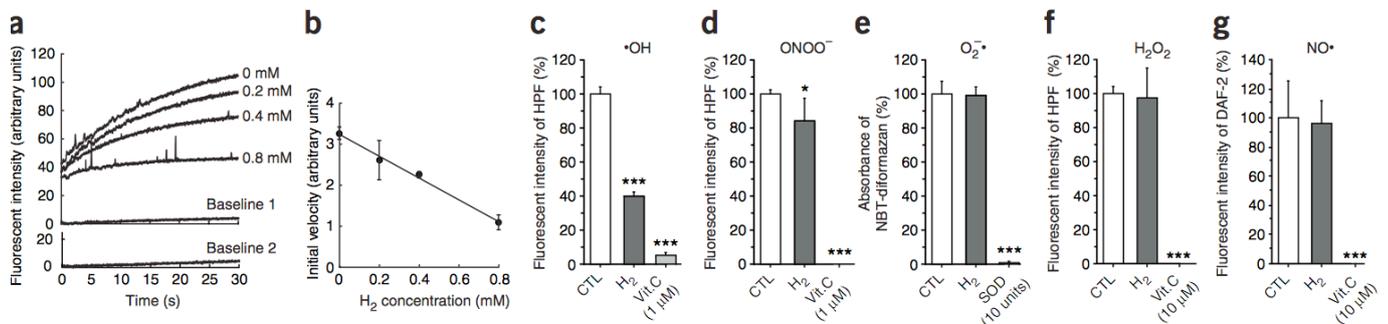
**Inhalation von  $H_2$ -Gas unterbindet fortschreitende Schädigungen**

Eine Woche nach der MCA-Okklusion erhöhte sich die Differenz im Infarkt Volumen zwischen unbehandelten und mit  $H_2$  behandelten Ratten, verglichen mit den Ergebnissen einen Tag nach der Okklusion **(Abb. 6a,b)**. Das Verhalten einer jeden Ratte, das nach einem neurologischen Punktesystem eingestuft wurde<sup>27</sup>, zeigte, dass die Inhalation von  $H_2$  während der Ischämie und der Reperfusion die Bewegungsfähigkeit verbesserte **(Abb. 6c)**. Während außerdem das Körpergewicht und die Körpertemperatur von Ratten, die kein  $H_2$  inhalierten, langsam abnahm, stellte sich beides bei den Ratten, die  $H_2$  inhalierten, schließlich wieder her **(Abb. 6d,e)**. Somit konnte nachgewiesen werden, dass  $H_2$  nicht nur die anfängliche Hirnschädigung unterband, sondern auch fortschreitende Schädigungen.

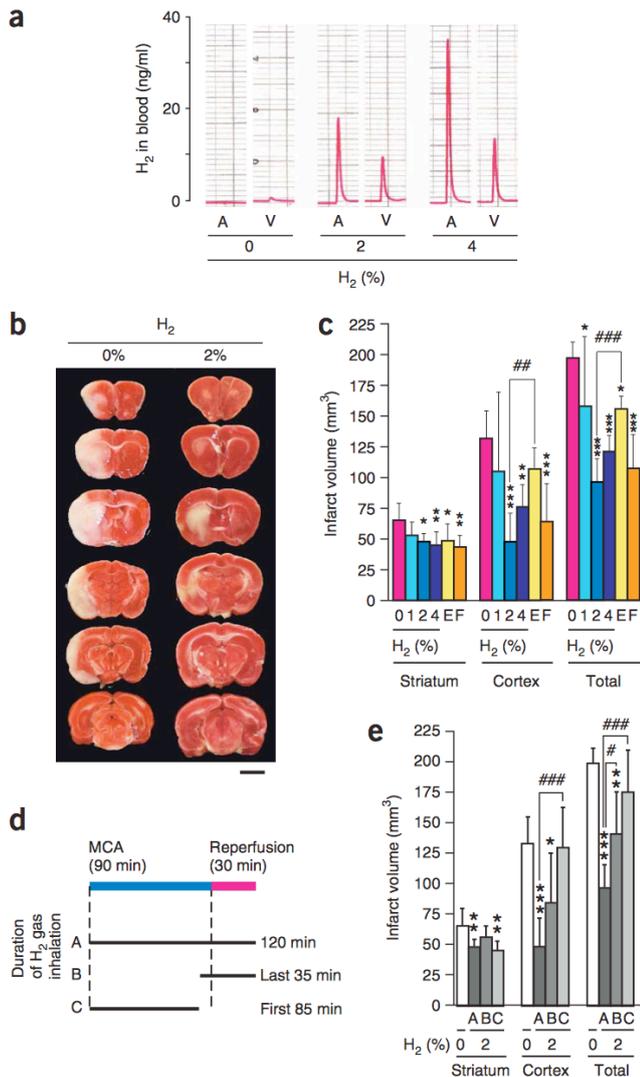
Wir untersuchten durch  $H_2$  herbeigeführte molekulare Veränderungen 12 Stunden, 3 Tage bzw. 7 Tage nach der Okklusion, indem wir eine Anfärbung von Hirnschnitten mit Antikörpern zu 8-OH-G vornahmen, um das Ausmaß der Oxidation von Nukleinsäuren zu messen **(Zusatz-Abb. 6)**, sowie mit Antikörpern zu HNE, um das Ausmaß der Lipidperoxidation zu messen

MCA) für 90 Minuten und leiteten dann die Reperfusion für 30 Minuten ein<sup>23</sup>. Bei drei der vier Ausgangsbedingungen inhalierten die Ratten ein Gemisch aus  $H_2$ - und Distickstoffmonoxid-Gas ( $N_2O$ ) zur Einleitung einer Narkose während des gesamten 120 Minuten dauernden Prozesses (die Volumenverhältnisse von  $H_2$ ,  $O_2$  und  $N_2O$  waren a) 1% : 30% : 69%; b) 2% : 30% : 68% und c) 4% : 30% : 66%). Bei der vierten Ausgangsbedingung war  $H_2$  abwesend; hier betrug die Volumenverhältnisse von  $H_2$ ,  $O_2$  und  $N_2O$  0% : 30% : 70%. Wir nahmen eine sorgfältige Überprüfung der physiologischen Parameter während der Experimente vor (siehe „Methoden“) und stellten keine signifikanten Veränderungen als Resultat der Inhalation von  $H_2$  fest **(Ergänzungstabelle 1)**.

Wir stellten auch keinen signifikanten Einfluss auf den zerebralen Blutfluss fest, gemessen am Doppler-Effekt<sup>24</sup> **(Zusatz-Abb. 5)**. Die Konzentration des im arteriellen Blut gelösten  $H_2$  erhöhte sich durch Inhalation von  $H_2$  proportional zur inhalierten Menge; die Konzentration des im venösen Blut gelösten  $H_2$  war geringer als im arteriellen Blut, was darauf schließen lässt, dass  $H_2$  vom Gewebe aufgenommen wurde **(Abb. 5a)**. Einen Tag nach der MCA-Okklusion nahmen wir eine Anfärbung von Hirnschnitten mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) vor, einem Substrat (Trägerstoff) für mitochondriale Respiration (Atmung) **(Abb. 5b)**. Wir überprüften das Infarkt Volumen durch Untersuchung der Anfärbung von Hirnregionen (weiße Färbung weist auf einen Infarkt hin, **Abb. 5b,c**) und



**Abb. 4:** Molekularer Wasserstoff in Lösung neutralisiert Hydroxyl-Radikale bei  $23^\circ C$  und einem pH-Wert von 7,4 in zellfreien Systemen. **(a,b):** Die Fenton-Reaktion, die Hydroxyl-Radikale produziert, wurde durch Hinzufügung von  $H_2O_2$  eingeleitet (bis zu einer Endkonzentration von  $5 \mu M$ ) in einer geschlossenen Küvette bei  $23^\circ C$  und bei schonendem Rührvorgang (siehe „Ergänzende Methoden“). Die Konzentrationen an  $\cdot OH$  in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von  $H_2$  in Lösung wurden auf ihre HPF-Fluoreszenz-Signale untersucht. **(a):** Repräsentative zeitliche Verlaufsspur der HPF-Fluoreszenz bei verschiedenen Konzentrationen von  $H_2$ . Die Grundlinien („Baseline“) 1 und 2 zeigen HPF-Fluoreszenz (in Gegenwart von  $0,8 mM$   $H_2$ ) unter Abwesenheit von  $H_2O_2$  (Grundlinie 1) und unter Abwesenheit von Eisenperchlorat (Grundlinie 2). **(b):** Durchschnittliche Standardabweichungen von anfänglichen Steigerungsraten der HPF-Fluoreszenz (vier eigenständige Experimente). **(c–g):** Konzentrationen von  $\cdot OH$  und zwei reaktiven Stickstoffspezies (RNS: Stickoxid ( $NO\cdot$ ) und Peroxynitrit ( $ONOO\cdot$ ), noch verblieben nach Inkubation mit  $0,6 mM$   $H_2$  bei  $23^\circ C$  (Details im Abschnitt „Ergänzende Methoden“). Vitamin C (Vit. C) und Superoxid-Dismutase (SOD) wurden als Positivkontrollen verwendet. Die erzeugten Signale unter Abwesenheit von  $H_2$  (CTL) wurden auf 100% festgesetzt. Die Daten repräsentieren durchschnittliche Standardabweichungen ( $n = 6$ ). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ . NBT-Diformazan: oxidierte Form von Nitroblau-Tetrazolium (NBT, ein Detektor von  $O_2\cdot^-$ ). DAF-2: Diaminofluorescein-2 (ein Detektor von  $NO\cdot$ ).



**Abb. 5:** Die Inhalation von Wasserstoff-Gas übt einen wirksamen Schutz gegen Schädigungen, hervorgerufen durch Ischämie bzw. Reperfusion, aus. **(a):** Im Tiermodell inhalierten Ratten für eine Stunde  $H_2$  und 30%  $O_2$  unter Narkose mit  $N_2O$  und Halothan (Narkosegas). Die Konzentrationen an  $H_2$  in arteriellem (A) und venösem (V) Blut wurden gemessen, und die Menge an  $H_2$  wurde mittels Gas-Chromatographie untersucht. **(b):** Bei Ratten wurde eine Okklusion der mittleren Zerebralarterie (MCA) vorgenommen. Während des 120-minütigen Ablaufs wurde die angegebene Konzentration des Gasgemischs von den Ratten inhaliert. Einen Tag nach der MCA-Okklusion wurde das Vorderhirn in sechs koronale sequenzielle (aufeinanderfolgende) Abschnitte geteilt und die Hirnschnitte mit dem mitochondrialen Respirationssubstrat TTC angefärbt. Maßstabsbalken: 5 mm. **(c):** Infarkt volumina des Hirns wurden in den Hirnschnitten berechnet. „E“ (gelb) und „F“ (orange) stehen für die Behandlung mit Edaravon und FK506 ( $n = 6$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , verglichen mit 0%  $H_2$ . ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$ , verglichen mit 2%  $H_2$ . **(d):** Schaubild des Experiments mit drei verschiedenen Zeiträumen, über die Wasserstoff-Gas (2%) inhaliert wurde. **(e):** Infarkt volumina des Hirns bei verschiedenen Zeiträumen, über die  $H_2$  inhaliert wurde (Berechnung wie in **c**) ( $n = 6$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , verglichen mit 0%  $H_2$ . # $P < 0,05$ , ### $P < 0,001$ , verglichen mit einer 120-minütigen Behandlung. A, B und C repräsentieren die verschiedenen Zeiträume der Inhalation von  $H_2$ -Gas (wiedergegeben in **d**). Balkendiagramme repräsentieren die durchschnittlichen Standardabweichungen.

kannten Antioxidantien, die nicht im Stande sind, mit Erfolg zu Organellen vorzudringen<sup>30</sup>, weist es vorteilhafte Verteilungsmerkmale auf: Es kann Biomembranen durchdringen und ins Cytosol (flüssige Bestandteile des Zytoplasmas) sowie in die Mitochondrien und den Zellkern diffundieren. Trotz der nur moderaten Reduktionsaktivität von  $H_2$  könnte seine Eigenschaft, als Gas rasch in alle Bereiche der Zelle zu diffundieren, es zu einem hocheffektiven Mittel zur Reduktion zellschädigender Radikale machen. Seine Fähigkeit, die Zell-DNA und die Mitochondrien effektiv zu schützen, weist darauf hin, dass es das Risiko von Erkrankungen durch ungesunde Lebensführung und das Krebsrisiko verringern könnte.

$H_2$  bewirkte eine deutliche Verringerung von oxidativem Stress und unterband Hirnschäden, die von induzierter Ischämie bzw. Reperfusion hervorgerufen wurden. Die Inhalation von  $H_2$ -Gas war deutlich wirkungsvoller als eine zur Zeit zugelassene Behandlung von Hirninfarkten und verminderte auch durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufene Leberschäden (K. Fukuda, S.A., M.I., Y. Yamamoto, I.O. und S.O., unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die vorteilhaften Effekte von  $H_2$  nicht auf Hirnverletzungen beschränkt sind, sondern auch zur Behandlung von Verletzungen in anderen Organen dienlich sein können.

Diese Studie konnte nachweisen, dass  $H_2$  durch Einfangen und Neutralisieren von  $\bullet OH$  einen effektiven Schutz von Zellen und Gewebe gewährleisten kann. Es bleibt allerdings auch noch die Möglichkeit, dass  $H_2$  auch einen Schutz vor oxidativem Stress bietet, indem es direkt oder indirekt andere stark oxidative Spezies in lebenden Zellen reduziert. So kann  $H_2$  z.B. zellschützende Faktoren anregen bzw. einleiten; wir fanden jedoch keine durch  $H_2$  induzierten Veränderungen in der Expression verschiedener Gene, die bei Reduktionsprozessen oder beim Schutz von Zellen beteiligt sind (K.N., M.I., I.O. und S.O., unveröffentlichte Daten). Weitere Studien werden die Mechanismen offen legen, mittels derer  $H_2$  Zellen und Gewebe vor oxidativem Stress schützt.

Akuter oxidativer Stress kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, u.a. Entzündungen, intensive sportliche Belastungen, Herzinfarkt, Unterbrechung der Durchblutung und Organtransplantationen. Zur Behandlung könnte in einer Salzlösung gelöstes  $H_2$  auf einfache Weise intravaskulär (hier: in ein Blutgefäß) verabreicht werden. Zur allgemeinen Vorbeugung vor oxidativem Stress könnte mit  $H_2$  angereichertes Wasser verabreicht werden. Die Inhalation von  $H_2$  wurde bereits bei der Vorbeugung vor der Dekompressionskrankheit bei Tauchern angewandt und zeigte dabei ein gutes Sicherheitsprofil<sup>31</sup>. Beachtenswert ist auch, dass bei  $H_2$  in Konzentrationen unterhalb von 4,7% in der Luft kein Risiko der Entflammbarkeit oder Explosion besteht. Wir unterbreiten deshalb den Vorschlag, dass  $H_2$ , eines der bekanntesten Moleküle, als ein sicheres und effektives Antioxidans mit minimalen Nebenwirkungen breite Anwendung bei medizinischen Maßnahmen und Verfahren finden könnte.

## METHODEN

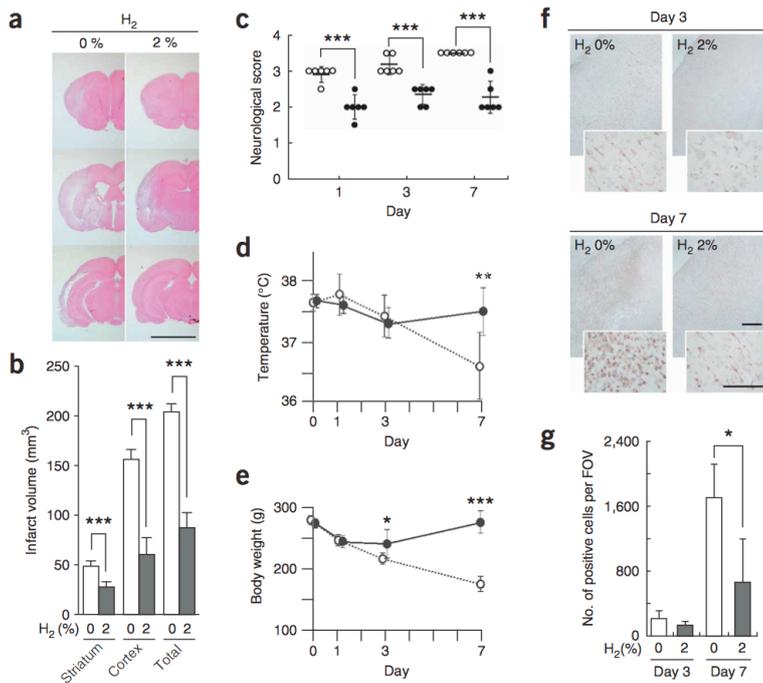
**Wasserstoff- und Sauerstoff-Messungen.** Wir nahmen Messungen der Konzentrationen an gelöstem molekularem Wasserstoff ( $H_2$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ) vor, indem wir jeweils eine Wasserstoff-Messelektrode (von ABLE) und eine Sauerstoff-Messelektrode (von Strathkelvin Instruments) verwendeten. Wir bestimmten die Wasserstoff-Gaskonzentration durch Gas-Chromatographie (Teramecs). Um die  $H_2$ -Konzentration im Blut zu messen, wurden die im

**(Zusatz-Abb. 6).** Bei jedem dieser beiden oxidativen Marker stellten wir eine deutliche Reduktion der Anfärbung bei mit  $H_2$  behandelten Ratten, im Vergleich zu unbehandelten Ratten, fest. Wir nahmen auch eine Anfärbung identischer Regionen des Hirns mit Antikörpern zu Iba1 (einem Marker für Mikrogliazellen, Immunzellen des zentralen Nervensystems)<sup>28</sup> und Antikörpern zu GFAP (saures Gliafaserprotein, ein hirnspezifisches Protein) vor, die jeweils spezifisch für aktivierte Mikrogliazellen bzw. Astrozyten (sternförmige Zellen um Gehirnneuronen) sind (**Abb. 6f,g** und **Zusatz-Abb. 6**). Wir stellten eine deutlich ausgeprägte, von  $H_2$  abhängige Abnahme der Anhäufung von Mikrogliazellen fest, was auf eine Entzündung und einen Umbauprozess hinweist. Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass  $H_2$  oxidativen Stress deutlich senken und Hirnschädigungen unterbinden kann.

## DISKUSSION

Diese Studie weist nach, dass molekularer Wasserstoff in vitro ROS selektiv reduzieren kann. Da  $\bullet OH$  und ONOO- sehr viel reaktiver als andere ROS sind<sup>14</sup>, ist es naheliegend, dass  $H_2$  nur mit den stärksten Oxidantien eine Reaktion eingeht. Dies ist von Vorteil für medizinische Maßnahmen und Verfahren, da es bedeutet, dass die Verwendung von  $H_2$  keine ernsthaften oder unerwünschten Nebenwirkungen haben sollte. Es ist anzunehmen, dass  $H_2$  als Antioxidans mild genug ist, keine Störungen bei metabolischen Oxidation-Reduktions-Reaktionen oder bei ROS, die eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Zellsignalen spielen, hervorzurufen — im Gegensatz zu einigen antioxidativen Nahrungsmittelergänzungen mit stark reduktiver Reaktionsfähigkeit, die die Mortalität (Sterblichkeit) möglicherweise durch negative Einwirkung auf wesentliche körperliche Abwehrmechanismen erhöhen<sup>29</sup>.

$H_2$  hat als potenzielles Antioxidans eine Reihe von Vorteilen: Es neutralisiert effektiv  $\bullet OH$  in lebenden Zellen und, anders als die meisten be-



**Abb. 6:** Die Inhalation von H<sub>2</sub>-Gas linderte die Auswirkungen von Hirnschäden nach einer Woche. Im Tiermodell inhalierten Ratten im Verlauf einer 120-minütigen Ischämie und Reperfusion Wasserstoff-Gas mit einer Konzentration von 2%, was für einen, drei bzw. sieben Tage aufrechterhalten wurde. **(a):** Eine Woche nach der MCA-Okklusion nahmen wir einen Anschnitt der Hirne sowie eine Anfärbung mit Hämatoxylin und Eosin vor. Drei repräsentative Anschnitte werden hier wiedergegeben. Maßstabsbalken: 5 mm. **(b):** Infarkt-volumina (die schwach rosa gefärbten Regionen in a) wurden berechnet (n = 6). \*\*\*P < 0,001. **(c):** Ein neurologisches Punktesystem mit einer Skala von 0 bis 5 wurde, wie zuvor beschrieben, zur Auswertung herangezogen<sup>27</sup>; 0 entspricht keinem neurologischen Defizit; 1 entspricht einem Unvermögen, die rechte Vorderpfote voll auszustrecken; 2 entspricht einer Kreisbewegung nach rechts; 3 entspricht einem Fallen nach rechts; 4 entspricht einer Unfähigkeit, spontan zu laufen, und 5 entspricht dem Ableben des Tiers. Bei der Beurteilung des neurologischen Punktwerts für die jeweilige Ratte zwischen 1 und 2, 2 und 3, oder 3 und 4 wurde der Punktwert jeweils auf 1,5, 2,5 und 3,5 gesetzt. Weiße bzw. schwarze Punkte repräsentieren die Behandlung mit bzw. ohne H<sub>2</sub> (n = 6). \*\*\*P < 0,001. **(d,e):** Körpergewicht und -temperatur wurden mit (schwarze Punkte) bzw. ohne (weiße Punkte) Inhalation von Wasserstoff-Gas mit einer Konzentration von 2% kontrolliert (n = 6). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001. **(f):** Am dritten bzw. siebten Tag nach der MCA-Okklusion wurden koronale 6-µm-Schnitte aus dem Ischämie-Kernbereich im temporalen Kortex mit Antikörpern zu Iba1 angefärbt. Maßstabsbalken: 200 µm (100 µm in den Einblendungen unten). **(g):** Iba1-positive Mikroglia<sup>28</sup> pro Sichtfeld wurden im Ischämie-Kernbereich gezählt, wie in f angegeben (n = 6). \*P < 0,05. Daten zeigen die durchschnittlichen Standardabweichungen.

Tiermodell eingesetzten Ratten zunächst mit Heparin vorbehandelt, um Blutgerinnungen vorzubeugen. Daraufhin wurden jeweils 5 ml arterielles und venöses Blut in Reagenzgläser gefüllt und die Blutproben unmittelbar danach in verschlossene Aluminiumbeutel gegeben, die 30 ml Luft enthielten. Nachdem das H<sub>2</sub>-Gas vollständig aus dem Blut in die Luft im verschlossenen Beutel entwichen war, entnahmen wir 20 ml Luft für die Gas-Chromatographie, um die Konzentration von H<sub>2</sub> zu quantifizieren.

**Wasserstoff-Behandlung von kultivierten Zellen.** Über eine Zeitraum von zwei Stunden lösten wir H<sub>2</sub> über die Sättigungsgrenze hinaus unter einem Druck von 0,4 MPa (4 bar) in einem DMEM-Medium (standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen). Wir lösten O<sub>2</sub> in einem zweiten Medium durch Einsprudeln von O<sub>2</sub>-Gas bis zur Sättigungsgrenze (42,5 mg/l), und CO<sub>2</sub> in einem dritten Medium durch Einsprudeln von CO<sub>2</sub>-Gas. Alle drei Medien wurden auf atmosphärischem Umgebungsdruck gehalten. Wir kombinierten dann die drei Medien (H<sub>2</sub>-Medium : O<sub>2</sub>-Medium : CO<sub>2</sub>-Medium) im Volumenverhältnis 75% : 20% : 5% und fügten fetales Kälberserum (FKS, Nährmedium für Zellkulturen) hinzu, um eine Endkonzentration von 1% zu erreichen. Zur Kultivierung fügten wir das kombinierte Medium in eine Zellkulturflasche und überprüften unmittelbar danach die H<sub>2</sub>- bzw. O<sub>2</sub>-Konzentration mit einer H<sub>2</sub>- bzw. O<sub>2</sub>-Messelektrode. Dann füllten wir die Zellkulturflasche mit einem Gasgemisch, das aus 75% H<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> und kultivierten Zellen in einer geschlossenen Zellkulturflasche bestand. Dann bereiteten wir ein entgastetes Medium ohne H<sub>2</sub> zu, indem wir das Medium, das mit H<sub>2</sub> gesättigt war, für eine Zeitdauer von 4 Stunden in einem offenen Gefäß rührten, und prüften dann die H<sub>2</sub>-Konzentration mit einer Wasserstoff-Messelektrode. In den Experimenten zur Dosisabhängigkeit von H<sub>2</sub> (Resultate in **Abb. 2f** wiedergegeben) verdünnten wir das kombinierte Medium mit einem vierten Medium mit 1% FKS, äquilibriert (abgeglichen) mit Luft, die 5% CO<sub>2</sub> enthielt, um die gewünschte H<sub>2</sub>-Konzentration zu erhalten. Wir füllten die Zellkulturflaschen dann mit dem Gasgemisch, das mit Luft verdünnt wurde, die 5% CO<sub>2</sub> enthielt.

**Induktion von oxidativem Stress mit Antimycin A und Menadien.** Wir hielten PC12-Zellen bei einer Temperatur von 37°C in einem DMEM-Medium, das 1% FKS mit bzw. ohne 0,6 mM H<sub>2</sub> in einer geschlossenen Zellkulturflasche enthielt, die mit dem oben beschriebenen Gasgemisch gefüllt wurde. Wir behandelten die Zellen dann mit Menadien bzw. Antimycin A, die jeweils als Inhibitoren des (bereits unter „Ergebnisse“ beschriebenen) Komplex I bzw. Komplex III der mitochondrialen Elektronentransportkette fungieren, und produzierten so O<sub>2</sub>• (durch Beschleunigung des Elektronenaustritts). Nachdem das Antimycin A für eine Zeitdauer von 24 Stunden auf das Medium eingewirkt hatte, überprüften wir das Zellüberleben, indem wir manuell die Zellen zählten, die mit 1 µM Propidiumjodid doppelt angefärbt waren (tote Zellen in Rosa dargestellt)

und 5 µM Hoechst 33342 (tote und lebendige Zellen in Blau dargestellt) unter einem Floreszenz-Mikroskop. Um den Schutzeffekt von H<sub>2</sub> auf die Mitochondrien zu untersuchen, nahmen wir für 30 Minuten eine Vorbehandlung der Zellen mit 4,5 g/l 2-Deoxy-D-glucose (einem Glycolyse-Inhibitor) und 1 mM Pyruvat (einem Substrat der oxidativen Phosphorylierung, Anhängen einer Phosphatgruppe an ein organisches Molekül) vor, setzten sie dann Antimycin A mit bzw. ohne 0,6 mM H<sub>2</sub> aus und quantifizieren die zellulären ATP-Konzentrationen unter Verwendung eines zellulären ATP-Mess-Kits (TOYO B-Net.).

**Hirnfarkt-Modell.** Die Tierprotokolle wurden vom Animal Care and Use Committee of Nippon Medical School genehmigt. Wir narkotisierten männliche Sprague-Dawley-Ratten (Körpergewicht: 250–300 g) mit Halothan (4% zur Einleitung, 1% zur Aufrechterhaltung) in einem Gasgemisch aus Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Sauerstoff (Volumenverhältnis 70% : 30%). Mit einer thermostatisierten Heizdecke in Verbindung mit einer Temperatursonde im Rektum (Mastdarm) hielten wir eine konstante Temperatur von 37,5°C ± 0,5°C aufrecht und überwachten gleichzeitig die physiologischen Parameter (unter Verwendung einer Kanüle in der Schwanzarterie), einschließlich der Blutgaskonzentrationen (pCO<sub>2</sub> und pO<sub>2</sub>), pH-Wert, Blutzuckerspiegel und Blutdruck. Wir versuchten, konstante Konzentrationen von pH und pO<sub>2</sub> aufrechtzuerhalten, indem wir die Menge an Halothan und das Verhältnis von N<sub>2</sub>O zu O<sub>2</sub> kontinuierlich nachregulierten. Wir induzierten eine fokale zerebrale Ischämie, indem wir mit der intraluminalen (im Innern eines Gefäßes liegenden) Fadenschluss-Technik eine Okklusion der mittleren Zerebralarterie (Hirnarterie, MCA) vornahmen. Dazu verwendeten wir ein Nylon-Monofilament (Einzelfaden) mit abgerundeten Enden und einem distalen (körperfernen) Silikon-Gummizylinder, wie zuvor beschrieben<sup>23</sup>. Der 90-minütigen Okklusion der MCA folgte eine Reperfusion-Phase von 30 Minuten. Während des gesamten Ablaufs inhalieren die Ratten H<sub>2</sub>-Gas, ausgenommen die Experimente, die den **Abb. 5d,e** entsprechen. Wir behandelten die Ratten mit Edaravon und FK506, wobei wir die effektivsten Konzentrationen einsetzten<sup>23,25</sup> (**Abb. 5c**). Nach dem Wiedererwachen aus der Narkose wurde für die Ratten eine Umgebungstemperatur von 23°C aufrechterhalten.

24 Stunden nach der MCA-Okklusion entfernten wir die Hirne unter Narkose und schnitten sie in sechs koronale sequenzielle Sektionen (jeweils 2 mm dick). Wir färbten die Sektionen mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (3%) an und nahmen dann Messungen der Infarkt- bzw. Nicht-Infarkt-Bereiche vor, wozu ein optisches Dissektor- (Sezierer-) Bildanalysesystem (Mac Scope, Mitsuya Shoji) verwendet wurde. Wir kennzeichneten die Grenze zwischen Infarkt- und Nicht-Infarkt-Gewebe und gelangten an den Infarktbereich durch Entfernung des nicht verletzten Bereiches der ipsilateralen Hemisphäre (auf derselben Körperseite befindlichen Hirnhälfte) von dem der kontralateralen (auf der entgegengesetzten Seite befindlichen) Hemisphäre. Wir berechneten die Infarkt-volumina

anhand der Formel „Infarktbereich x Dicke“. 12 Stunden, 3 bzw. 7 Tage nach der MCA-Okklusion entnehmen wir umgehend die Hirne unter Narkose und fixierten sie mit 10% Formalin. Wir schnitten dann paraffin-eingebettete Hirngewebeproben in eine Reihe von 6 µm dicken Sektionen und färbten diese mit Hämatoxylin bzw. Eosin (H&E) an. Dann quantifizieren wir die rosa angefärbten Bereiche mit einem grafischen Analysesystem (Mac Scope). Zur Immunmarkierung färbten wir die Sektionen mit Antikörpern unter Verwendung von VECTASTAIN ABC-Reagenzien (Detektionssysteme für die Immunologie und Molekularbiologie) nach Vorgaben des Anbieters.

**Statistische Analyse.** Zur Erstellung der statistischen Analysen verwendeten wir die StatView-Software (SAS Institut). Für Einzelvergleiche führten wir einen unpaarigen zweiseitigen Student t-Test durch; für Mehrfachvergleiche führten wir eine Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem exakten Fisher-Test durch. Wir führten Experimente zur Quantifizierung in Form einer Blindanalyse durch.

*Anmerkung: Weitergehende Informationen sind auf der Webseite des Nature Medicine erhältlich.*

#### DANKSAGUNGEN

Diese Studie wurde durch Zuschussmittel an Shigeo Otah (S.O.) vom japanischen Ministerium für Gesundheit, Arbeit und Soziales gefördert (H17-Chouju-009, „Longevity Science“ und 17A-10, „Nervous and Mental Disorders“) sowie vom japanischen Ministerium für Bildung, Kultur, Sport, Wissenschaft und Technologie (16390257).

#### AUTORENBEITRÄGE

S.O. konzipierte die Experimente. S.O., I.O., K.K. und Y.K. gestalteten und entwickelten die Experimente. I.O., S.A. und S.O. nahmen die Datenanalysen vor. I.O., M.I., K.T., M.W., K.N., K.Y., S.A. und S.O. führten die Experimente durch. S.O. und I.O. verfassten die Studie.

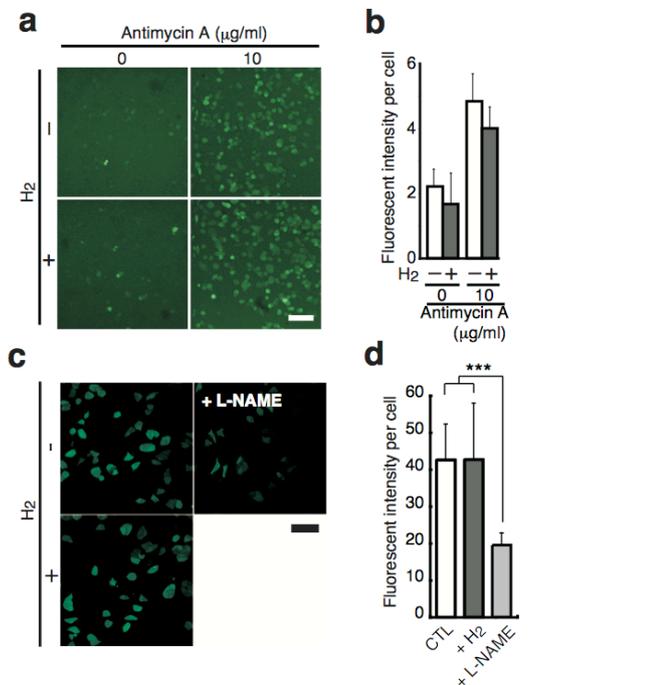
#### ERKLÄRUNG HINSICHTLICH KONKURRIERENDER INTERESSEN

Die Autoren erklären hiermit, keine miteinander konkurrierenden finanziellen Interessen zu verfolgen.

Veröffentlicht online unter: <http://www.nature.com/naturemedicine>  
Informationen zu Nachdrucken und Genehmigungen sind online verfügbar unter <http://npg.nature.com/Reprintsandpermissions>

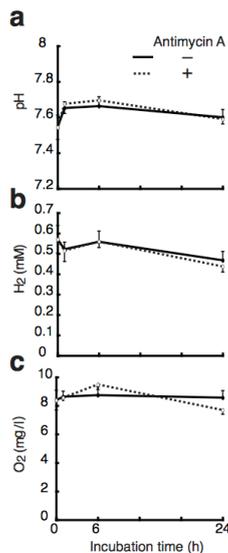
#### Quellenangaben (englisch)

- Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359–407 (2005).
- Reddy, P.H. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 96, 1–13 (2006).
- Ohta, S. A multi-functional organelle mitochondrion is involved in cell death, proliferation and disease. *Curr. Med. Chem.* 10, 2485–2494 (2003).
- Wright, E., Jr., Scism-Bacon, J.L. & Glass, L.C. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.* 60, 308–314 (2006).
- Winterbourn, C.C. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 181, 223–227 (2002).
- Chinopoulos, C. & Adam-Vizi, V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* 273, 433–450 (2006).
- Sauer, H., Wartenberg, M. & Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11, 173–186 (2001).
- Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 335–344 (2003).
- Sheu, S.S., Nauduri, D. & Anders, M.W. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 256–265 (2006).
- Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I.I. & Finkel, T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ. Res.* 97, 967–974 (2005).
- Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signalling. *Biosci. Rep.* 24, 452–474 (2004).
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P. & Ross, A.B. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $_{OH}/_{O}$ ) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17, 513–886 (1988).
- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yasuda, C., Kamino, K. & Ohta, S. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J. Neurochem.* 84, 1110–1117 (2003).
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J. & Nagano, T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* 278, 3170–3175 (2003).
- Tomizawa, S. et al. The detection and quantification of highly reactive oxygen species using the novel HPF fluorescence probe in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neurosci. Res.* 53, 304–313 (2005).
- Kamiya, H. Mutagenicities of 8-hydroxyguanine and 2-hydroxyadenine produced by reactive oxygen species. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 475–479 (2004).
- Petersen, D.R. & Doorn, J.A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 937–945 (2004).
- Falick, A.M., Mahan, B.H. & Myers, R.J. Paramagnetic resonance spectrum of the  $^{1}Dg$  oxygen molecule. *J. Chem. Phys.* 42, 1837–1838 (1965).
- Asoh, S. et al. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 17107–17112 (2002).
- Halestrap, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 232–237 (2006).
- Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431–1568 (1999).
- Ferrari, R. et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1699–1711 (2004).
- Nito, C., Kamiya, T., Ueda, M., Arai, T. & Katayama, Y. Mild hypothermia enhances the neuroprotective effects of FK506 and expands its therapeutic window following transient focal ischemia in rats. *Brain Res.* 1008, 179–185 (2004).
- Takada, J. et al. Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain is augmented in aged rats. *Exp. Gerontol.* 38, 423–429 (2003).
- Zhang, N. et al. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke* 36, 2220–2225 (2005).
- Labiche, L.A. & Grotta, J.C. Clinical trials for cytoprotection in stroke. *NeuroRx* 1, 46–70 (2004).
- Murakami, K. et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J. Neurosci.* 18, 205–213 (1998).
- Ito, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57, 1–9 (1998).
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G. & Gluud, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *J. Am. Med. Assoc.* 297, 842–857 (2007).
- James, A.M., Cocheme, H.M. & Murphy, M.P. Mitochondria-targeted redox probes as tools in the study of oxidative damage and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 982–986 (2005).
- Fontanari, P. et al. Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive. *Eur. J. Appl. Physiol.* 81, 325–328 (2000).



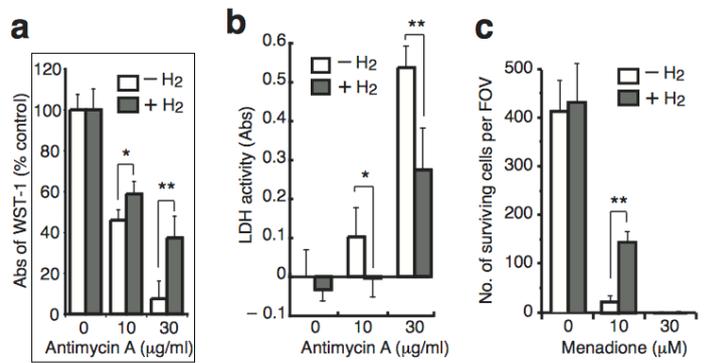
**Zusatz-Abb. 1: In einem Kulturmedium gelöster molekularer Wasserstoff übt keine reduzierende Wirkung auf zelluläres Wasserstoffperoxid und Stickoxid aus.**

(a) PC12-Zellen wurden in ein Medium mit bzw. ohne 0,6 mM H<sub>2</sub> eingebracht, und Antimycin A (10 µg/ml) wurde dem Medium hinzugefügt, um die Produktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zu induzieren, welches umgehend in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt wurde. Repräsentative konfokale Laser-Raster-Mikroskopaufnahmen der Fluoreszenz des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Markers 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF) wurden eine Stunde nach Hinzufügung von Antimycin A angefertigt. Maßstabsbalken: 100 µm. (b) DCF-Fluoreszenz in mit Antimycin A behandelten Zellen unter An- bzw. Abwesenheit von 0,6 mM H<sub>2</sub> wurde bei jedem eigenständigen Experiment von 100 Zellen quantifiziert, unter Verwendung des NIH-Bildbearbeitungsprogramms (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4). (c, d) Zelluläres NO<sup>•</sup> wurde nachgewiesen mit einem zellulären NO<sup>•</sup>-spezifischen fluoreszierenden Marker, DAF-2 DA (Diaminofluorescein-2-Diacetat, erworben von Daiichi Pure Chemicals Co.) durch konfokale Laser-Raster-Mikroskopie jeweils unter Verwendung von Anregungs- und Emissionsfiltern bei 488 und 510 nm Wellenlänge. Als negative Kontrolle wurde ein NOS-Synthase-Inhibitor (Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester, „L-NAME“, erworben von Sigma) hinzugefügt, um die Bildung von NO<sup>•</sup> zu unterbinden. Maßstabsbalken: 50 µm. (d) DAF-2 DA-Fluoreszenz wurde wie in (b) beschrieben quantifiziert (durchschnittliche Standardabweichung, n = 5). \*\*\*P < 0,001.



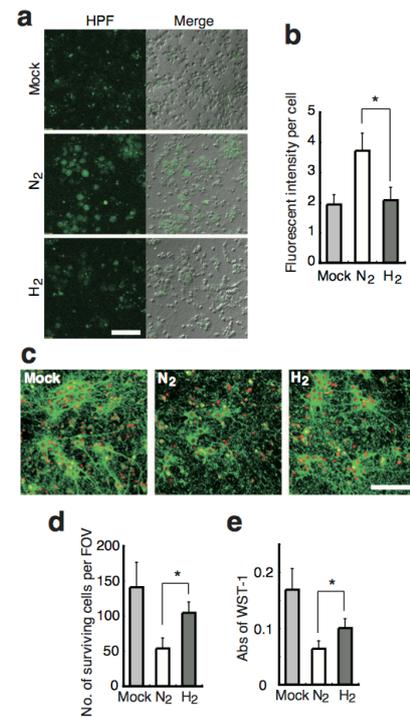
**Zusatz-Abb. 2: pH-, H<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Konzentrationen bleiben konstant in einem Kulturmedium in einer geschlossenen Zellkulturflasche, die mit einem Gasgemisch gefüllt ist.**

Ein DMEM-Kulturmedium mit darin gelöstem H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wurde wie unter „Methoden“ beschrieben angefertigt. PC12-Zellen (5 × 10<sup>5</sup>) wurden im Medium mit bzw. ohne Antimycin A (10 µg/ml) in einer geschlossenen Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) mit einem Gasgemisch bestehend aus 75% H<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur angegebenen Zeit wurden die Konzentrationen an pH, H<sub>2</sub> bzw. O<sub>2</sub> im Medium mit einem pH-Wert-Messgerät und mit einer H<sub>2</sub>- bzw. O<sub>2</sub>-Messelektrode gemessen. Für eine Messung wurde eine Zellkulturflasche herangezogen. Die Daten zeigen die durchschnittliche Standardabweichung (n = 4).



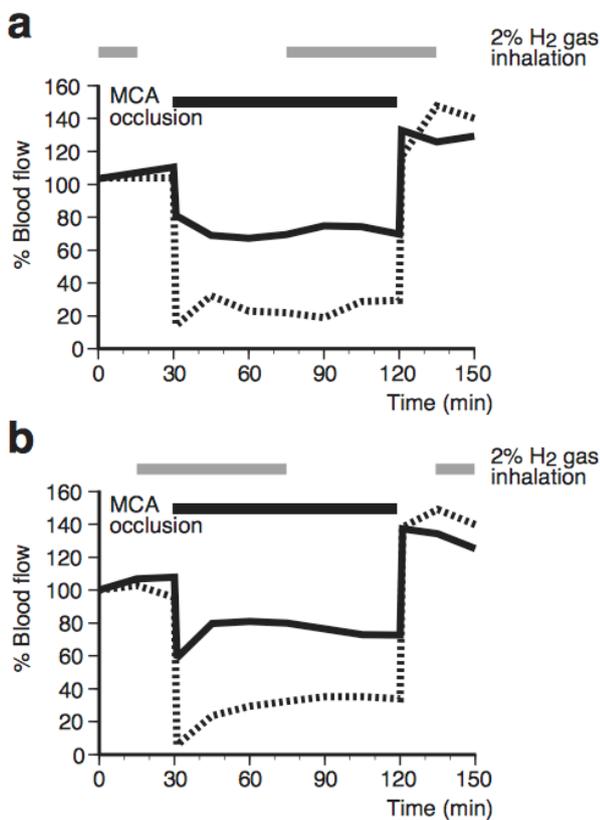
**Zusatz-Abb. 3: Mehrere Methoden weisen nach, dass H<sub>2</sub> die Zellen gegen oxidativen Stress schützt.**

PC12-Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von 0,6 mM H<sub>2</sub> mit der angegebenen Konzentration von Antimycin A (a, b) bzw. Menadion (c) inkubiert. Wie unter „Methoden“ beschrieben, wurden die jeweiligen H<sub>2</sub>-Konzentrationen für 24 Stunden aufrechterhalten. (a) Als weitere Methode wurde ein modifizierter MTT-Test (WST-1-Test, Test zur Bestimmung der Zellviabilität) mit einem Zellzahl-Kit (von Wako) durchgeführt, um den Schutzeffekt von H<sub>2</sub> gegen oxidativen Stress zu gewährleisten (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. (b) Laktatdehydrogenase- (LDH) Aktivitäten wurden gemessen, um das Ausmaß der Entweichung bzw. Leckage zellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) aus beschädigten Zellen zu bestimmen, und zwar mit einem LDH-Cytotoxik-Testkit (Wako). Die LDH-Aktivität in einem Medium mit Zellen, die nicht mit Antimycin A und H<sub>2</sub> behandelt wurden, wurde als Hintergrund genommen (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. (c) Statt Antimycin A wurde Menadion für einen Zeitraum von 24 Stunden zur Auslösung von oxidativem Stress verwendet, und die Anzahl lebender Zellen wurde wie in Abb. 2f gezählt (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4). \*\*P < 0,01.



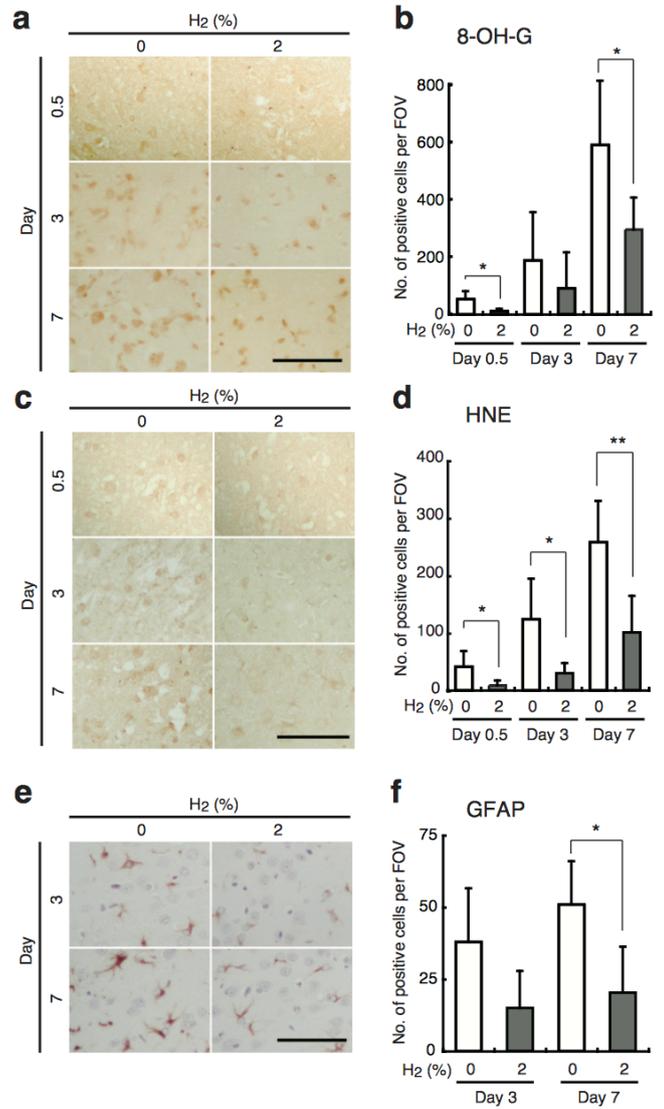
**Zusatz-Abb. 4: Molekularer Wasserstoff schützt kultivierte Neuronen vor Ischämie und Reperfusion in vitro.**

Im Tiermodell mit Ratten wurde eine Primärkultur von neokortikalen Zellen einem Sauerstoff- und Glucose-Entzug (OGD) ausgesetzt, wie unter „Ergänzende Methoden“ beschrieben. (a) Zehn Minuten nach der Reperfusion wurden die Zellen mit HPF angefärbt (links: Fluoreszenz-Bilder; rechts: Überlagerung der HPF-Fluoreszenz-Bilder mit differenziellen Nomarski-Interferenzkontrast-Bildern). „Mock“ bedeutet hier, dass Zellen mit einem DMEM-Medium behandelt wurden, das Glucose und Sauerstoff enthielt, statt einem OGD-Entzug ausgesetzt zu werden. Maßstabsbalken: 100 µm. (b) Die durchschnittliche HPF-Fluoreszenz-Intensität wurde in 100 Zellen gemessen (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4). \*P < 0,05. (c) 20 Stunden nach dem OGD-Entzug wurden die noch lebenden Neuronen mit dem neuronenspezifischen Antikörper zu TUJ-1 (grün) und mit Propidiumjodid (PI, rot) fixiert und immungefärbt. Maßstabsbalken: 100 µm. (d) Tote Zellen wurden im Anfärbungsprozess ausgewaschen, und lebende Zellen wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop in vier Sichtfeldern pro Vertiefung (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4) ausgezählt. \*P < 0,05. (e) 20 Stunden nach dem OGD-Entzug wurde die Zellviabilität in einer Vertiefung mittels eines modifizierten MTT-Tests (WST-1-Test) mit einem Zellzahl-Kit bestimmt (durchschnittliche Standardabweichung, n = 4). \*P < 0,05.



**Zusatz-Abb. 5: Hirndurchblutung wird durch H<sub>2</sub>-Inhalation nicht beeinflusst.**

Wie in „Methoden“ beschrieben, wurde eine Okklusion der mittleren Zerebralarterie vorgenommen. Der zerebrale Blutfluss wurde mittels Laser-Doppler-Durchflussmetrie gemessen unter Verwendung eines ALF21 (ADVANCE Co.) 2 mm seitlich des Bregmas (Schnittpunkt von Sagittal- und Koronararterie am Schädel) für die Penumbra (geschädigtes, aber funktionell noch intaktes Nervengewebe, durchgezogene Linie) und 5 mm seitlich des Bregmas für den ischämischen Kernbereich (gestrichelte Linie). Die Zeitperioden der H<sub>2</sub>-Inhalation (2%) und der Okklusion der Zerebralarterie sind jeweils durch graue und durchgehende dicke Linien gekennzeichnet.



**Zusatz-Abb. 6: Nach der Induktion der Hirnverletzung durch Ischämie und Reperfusion mit bzw. ohne H<sub>2</sub>-Behandlung wurde das Hirn immungefärbt.**

Zwölf Stunden (0,5 Tage), 3 bzw. 7 Tage nach der MCA-Okklusion wurden die Hirne fixiert und in Paraffin eingebettet. Koronale 6- $\mu$ m-Anschnitte wurden mit Antikörpern zu 8-OH-G im Bereich der ischämischen Penumbra im temporalen Kortex angefärbt (a); mit Antikörpern zu HNE im Bereich der ischämischen Penumbra im temporalen Kortex (c), und mit Antikörpern zu GFAP im Bereich der ischämischen Penumbra im okzipitalen (im Hirnhaupt gelegenen) Kortex (e). Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m. Positive Zellen mit Antikörpern zu 8-OH-G (b), HNE (d) und GFAP (f) pro Gesichtsfeld wurden in exakt denselben Regionen in Form einer Blindanalyse gezählt (durchschnittliche Standardabweichung, n = 6). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

## Ergänzende Methoden

**Nachweis von ROS durch Fluoreszenz-Indikatoren.** Wir behandelten PC12-Zellen für 30 Minuten mit 10  $\mu\text{M}$  5-(und-6)-Chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, Acetyl-Ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, erworben von Molecular Probes), 5  $\mu\text{M}$  Diaminofluorescein-2-Diacetat (DAF-2 DA) (erworben von Daiichi Pure Chemicals Co.) bzw. 5  $\mu\text{M}$  of 2-[6-(4'-Hydroxy)Phenoxy-3H-Xanthen-3-on-9-yl]-Benzozat (HPF, erworben von Daiichi Pure Chemicals Co.), um jeweils zelluläres H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO• bzw. •OH nachzuweisen. Wir erstellten Fluoreszenz-Bilder durch konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (Olympus FV300) jeweils unter Verwendung von Anregungs- und Emissionsfiltern bei 488 und 510 nm Wellenlänge. HPF kann durch •OH, Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) und Lipidperoxide spezifisch oxidiert werden, jedoch nicht durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO• bzw. O<sub>2</sub>•<sup>-14</sup>. Zum Nachweis von zellulärem O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> verwendeten wir 0,5  $\mu\text{M}$  MitoSOX (erworben von Molecular Probes) und machten Aufnahmen jeweils unter Verwendung von Anregungs- und Emissionsfiltern bei 543 und 565 nm Wellenlänge. Fluoreszenz-Signale wurden in jedem eigenständigen Experiment von 100 Zellen unter Verwendung NIH-Bildbearbeitungssoftware quantifiziert.

**Anfärbung von Mitochondrien.** Für die Anfärbung von Mitochondrien verwendeten wir MitoTracker Green (MTGreen) (1  $\mu\text{M}$ , von Molecular Probes) und Tetramethylrhodamin-Methyl-Ester (TMRM) (100 nM, von Molecular Probes). Fluoreszenz von MTGreen ist unabhängig vom Membranpotenzial, wohingegen die von TMRM auf das Membranpotenzial reagiert. MTGreen und TMRM wurden nachgewiesen jeweils unter Verwendung von Anregungsfiltern bei 488 und 543 nm und Emissionsfiltern bei 510 und 565 nm Wellenlänge.

**Immunfärbung.** Wir erwarben Antikörper gegen HNE und 8-OH-G von Nikken Seil Co. und Antikörper gegen TUJ-1 und GFAP von COVANCE und ThermoFisher. Wir verwendeten BODIPY FL Goat-Anti-Mouse IgG (von Molecular Probes) als sekundären Antikörper und visualisierten die Signale mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Die Fluoreszenz-Signale als Reaktion auf 8-OH-G und HNE wurden mit NIH-Bildbearbeitungssoftware quantifiziert.

**Intrazelluläre Fenton-Reaktion.** Wir präinkubierten PC12-Zellen für 30 Minuten mit 1 mM CuSO<sub>4</sub>, das 1% FKS enthielt, wuschen sie dann einmalig mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), die CaCl<sub>2</sub> (0,1 g/l), MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,1 g/l), Glucose (1g/l) und Natriumpyruvat (0,036 g/l) (pH 7,2) enthielt, und setzten sie dann wie oben beschrieben für eine Stunde der angegebenen Konzentration von Ascorbat (Vitamin C) in einer phosphatgepufferten Salzlösung aus. Als Negativkontrollen wurden CuSO<sub>4</sub> bzw. Ascorbat weggelassen. Beachten Sie, dass Cu<sup>+2</sup> durch das Ascorbat zu Cu<sup>+</sup> reduziert wird, welches die Fenton-Reaktion zur Produktion von •OH aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert, die spontan in den Zellen stattfindet.

**Messung der Elektronenspinresonanz.** Wir verwendeten 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) als Fänger für freie Radikale und wiesen die Signale der Elektronenspinresonanz (ESR) mit einem KEYCOM ESR-Spektrometer Typ ESR-X01 nach. Als Standardwert für die Reaktion von •OH mit DMPO erzeugten wir durch die Fenton-Reaktion •OH in einem Gemisch aus 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 1 mM FeCl<sub>2</sub> in Gegenwart von 0,1 mM DMPO und nahmen an der Gesamtlösung eine ESR-Messung vor. Für die Messungen normalisierten wir die Sensitivität eines jeden Experiments mit der Stärke des internen, von Mn<sup>2+</sup> abgeleiteten Signals. Um ein Spektrum zu erhalten, wurden die ESR-Signale für 2 Minuten gescannt, dann zehnmal akkumuliert und alle Signale dann gemittelt.

Für die Behandlung mit H<sub>2</sub> bereiteten wir ein Medium mit einer Konzentration von 0,6 mM H<sub>2</sub> und 8,5 mg/l O<sub>2</sub> und füllten dies in eine geschlossene Zellkulturflasche mit 75% H<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>-Gas. Wir nahmen eine 30-minütige Vorbehandlung von PC12-Zellen (2 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche) mit 0,1 M DMPO und 2 mM CuSO<sub>4</sub> im DMEM-Medium mit 1% FKS bei 37°C in An- bzw. Abwesenheit von 0,6 mM H<sub>2</sub> vor. Nach Entfernung dieses Mediums setzten wir die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur 0,2 mM Ascorbat und 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,3 ml PBS in An- bzw. Abwesenheit von 0,6 mM H<sub>2</sub> aus, um die Produktion von •OH durch die Fenton-Reaktion einzuleiten, und gaben die Zellen dann zur ESR-Messung in eine flache Küvette. Bei der anderen Methode präinkubierten wir für 7 Minuten bei Raumtemperatur PC12-Zellen (2 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche) in 0,3 ml PBS mit 0,1 M DMPO und 30  $\mu\text{g/ml}$  Antimycin in An- bzw. Abwesenheit von 0,6 mM H<sub>2</sub> und gaben die Zellen dann zur ESR-Messung in eine flache Küvette. Durch digitale Subtraktion eines Spektrums vom anderen erhielten wir ein Differenzspektrum zur Visualisierung der Signale, die durch die H<sub>2</sub>-Behandlung abgenommen hatten.

**Primärkultur.** Wir präparierten durch die bereits zuvor beschriebene Methode<sup>19</sup> Primärkulturen von neokortikalen Neuronen von 16 Tage alten Rattenembryos. Das Großhirngewebe wurde von Hirnhäuten gereinigt, zerkleinert und mit einem Protease-Cocktail (SUMILON) behandelt. Nach mechanischer Dissoziation durch Pipettieren resuspendierten wir die Zellen in einem Nervenzell-Kulturmedium (SUMILON) und nahmen dann mit ihnen eine Beschichtung auf Poly-L-lysin-beschichteten Platten mit einer Dichte von 5 x 10<sup>4</sup> Zellen / cm<sup>2</sup> vor, wechselten dann zum Neurobasal-Medium (Invitrogen) mit B-27 (Invitrogen) einmal alle drei Tage und verwendeten die Neuronen dann am Tag 11. Einen Tag vor dem OGD-Entzug wechselten wir das Medium zum Neurobasal-Medium mit B-27 minus AO (Invitrogen) und bestätigten die neuronale Identität durch Immunfärbung mit Antikörpern zum Neuronenmarker TUJ-1 sowie dem Astrozytenmarker GFAP. Wir verwendeten dabei für die Experimente nur Präparationen, die über 90% Neuronen enthielten.

**Sauerstoff- und Glucose-Entzug (OGD).** Zur Einleitung des OGD-Prozesses ersetzten wir das Kulturmedium durch ein DMEM-Medium mit einem Mangel an Glucose, aus dem O<sub>2</sub> entfernt wurde, und zwar durch Einsprudeln eines Gasgemischs aus entweder N<sub>2</sub> (95%) : CO<sub>2</sub> (5%) oder H<sub>2</sub> (95%) : CO<sub>2</sub> (5%) und hielten die Kultur für 60 Minuten bei 30°C unter einer Atmosphäre von entweder N<sub>2</sub> (95%) : CO<sub>2</sub> (5%) oder H<sub>2</sub> (95%) : CO<sub>2</sub> (5%). Die Behandlung wurde abgeschlossen durch Austausch des Experimentalmediums durch ein Stammkulturmedium und weiterer Inkubation bei 37°C mit Luft, die einen Anteil von 5% CO<sub>2</sub> enthielt.

**Reaktion auf H<sub>2</sub> in zellfreien Systemen.** Wir nahmen eine Fluoreszenz-Spektroskopie mit einem Shimadzu RF-5300PC-Fluoreszenz-Spektrometer vor. Zum Studium von Lösungen lösten wir für eine Zeitdauer von zwei Stunden H<sub>2</sub> in Wasser über die Sättigungsgrenze hinaus unter einem Wasserstoff-Druck von 0,4 MPa und verwendeten sie dann unter atmosphärischen Umgebungsdruckbedingungen. Wir bestimmten die H<sub>2</sub>-Konzentrationen bei jedem Experiment mit einer Wasserstoff-Messelektrode.

Um die Reaktion von H<sub>2</sub> mit der oxidierten Form von Cytochrom c, FAD bzw. NAD<sup>+</sup> nachzuweisen, inkubierten wir Lösungen mit 10  $\mu\text{M}$  Cytochrom c, 1 mM FAD bzw. 1 mM NAD<sup>+</sup> mit bzw. ohne 0,8 mM H<sub>2</sub> bei 23°C für 30 Minuten in einer geschlossenen Küvette und konnten keine Absorptions-Reaktion bei Wellenlängen von jeweils 415, 400 und 340 nm feststellen.

Wir überprüften das Reaktionsvermögen von H<sub>2</sub> mit verschiedenen ROS durch HPF, DAF-2 oder Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Wir maßen die Fluoreszenz-Signale von HPF und DAF-2 bei einer Wellenlänge von 515 nm mit Anregung bei jeweils 490 und 495 nm und die Reduktion von NBT zu NBT-Diformazan durch Absorption bei 550 nm.

Um die Reaktion von H<sub>2</sub> mit •OH nachzuweisen, mischten wir eine Wasserstoff-Lösung, einen Phosphat-Puffer (10 mM bei pH 7,4), Eisenperchlorat (0,1 mM) und HPF (0,4  $\mu\text{M}$ ). Wir leiteten die Fenton-Reaktion ein durch Hinzufügung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  in einer geschlossenen Küvette bei einer Temperatur von 23°C unter leichtem Rühren und einer 30-sekündigen Fluoreszenz-Messung.

Um die Reaktion von H<sub>2</sub> mit O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> zu messen, mischten wir Lösungen von Xanthin und NBT (von TREVIGEN) mit bzw. ohne 0,8 mM H<sub>2</sub> in einer geschlossenen Küvette, leiteten die Reaktion ein durch Hinzufügung von Xanthin-Oxidase bei 23°C und überprüften die Reaktion für einen Zeitraum von 5 Minuten.

Um die Reaktion von H<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachzuweisen, inkubierten wir Lösungen mit Phosphat-Puffer (10 mM bei pH 7,4) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) mit bzw. ohne H<sub>2</sub> (0,8 mM) in einer geschlossenen Glasröhre bei 23°C für 30 Minuten. Wir wandelten das verbliebene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu •OH durch 0,2  $\mu\text{M}$  Meerrettich-Peroxidase um und inkubierten dann mit 10  $\mu\text{M}$  HPF für 5 Minuten.

Um die Reaktion von H<sub>2</sub> mit NO• nachzuweisen, inkubierten wir Lösungen mit Phosphat-Puffer (10 mM bei pH 7,4) und 1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazin (NOC7, 0,1  $\mu\text{M}$ , von Dojin Chemicals Co.) mit bzw. ohne 0,8 mM H<sub>2</sub> in einer geschlossenen Küvette bei 23°C für 30 Minuten und prüften die Konzentration an verbliebenem NO• durch Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  DAF-2 für 10 Minuten.

Um die Reaktion von H<sub>2</sub> mit Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) nachzuweisen, verdünnten wir eine Stammlösung von 1  $\mu\text{M}$  ONOO<sup>-</sup> 200-fach in einem alkalischen Medium und einem 10 mM Phosphat-Puffer mit 0,4  $\mu\text{M}$  HPF in An- bzw. Abwesenheit von 0,8 mM H<sub>2</sub> und prüften die HPF-Signale bei 23°C für 1 Minute.

ERGÄNZUNGSTABELLE 1

Physiologische Parameter während der zerebralen Ischämie bzw. Reperfusion

preischemia						ischemia							
0% H <sub>2</sub>						0% H <sub>2</sub>							
No.	temp. (°C)	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	glucose (mg/dl)	pressure (mmHg)	No.	temp. (°C)	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	glucose (mg/dl)	pressure (mmHg)
1	37.4	7.47	39	107	120	110	1	37.4	7.42	44	89	130	145
2	37.5	7.39	51	113	114	95	2	37.1	7.40	51	98	117	120
3	37.5	7.47	43	109	119	108	3	37.4	7.44	47	115	115	130
4	37.4	7.46	43	134	120	110	4	37.0	7.42	48	119	117	150
5	37.1	7.44	40	109	103	110	5	37.5	7.42	42	113	105	150
6	37.2	7.45	39	125	110	120	6	37.5	7.44	41	112	105	153
Average	37.4	7.45	43	116	114	109	Average	37.3	7.42	46	108	115	141
S.D.	0.2	0.03	5	11	7	8	S.D.	0.2	0.02	4	12	9	13
2% H <sub>2</sub>						2% H <sub>2</sub>							
1	37.1	7.45	46	130	109	105	1	37.3	7.41	48	111	120	120
2	37.4	7.44	50	118	104	87	2	37.6	7.43	43	99	97	135
3	37.7	7.40	46	105	114	103	3	37.8	7.42	45	104	100	150
4	36.9	7.45	47	121	107	100	4	37.0	7.39	52	97	105	150
5	37.5	7.46	41	120	109	100	5	37.3	7.41	45	109	107	145
6	37.0	7.46	45	114	107	115	6	37.5	7.42	47	108	113	160
Average	37.3	7.44	46	118	108	102	Average	37.4	7.41	47	105	107	143
S.D.	0.3	0.02	3	8	3	9	S.D.	0.3	0.01	3	6	8	14
4% H <sub>2</sub>						4% H <sub>2</sub>							
1	37.6	7.48	36	118	113	120	1	37.0	7.40	48	110	105	145
2	37.2	7.45	40	134	96	112	2	36.8	7.40	46	107	94	120
3	37.6	7.46	43	119	90	125	3	37.0	7.41	47	83	91	130
4	36.7	7.46	39	128	103	120	4	37.6	7.43	43	111	97	145
5	36.8	7.43	45	111	97	120	5	37.4	7.45	44	105	100	140
6	37.5	7.49	34	127	103	100	6	37.4	7.44	46	110	105	150
Average	37.2	7.46	40	123	100	116	Average	37.2	7.42	46	104	99	138
S.D.	0.4	0.02	4	8	8	9	S.D.	0.3	0.02	0	11	6	11

reperfusion for 15 min						reperfusion for 30 min							
0% H <sub>2</sub>						0% H <sub>2</sub>							
No.	temp. (°C)	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	glucose (mg/dl)	pressure (mmHg)	No.	temp. (°C)	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	glucose (mg/dl)	pressure (mmHg)
1	37.3	7.39	45	101	132	155	1	37.5	7.41	41	110	135	140
2	37.2	7.40	52	94	108	135	2	37.4	7.40	49	97	111	130
3	37.3	7.46	44	105	113	135	3	37.0	7.40	51	109	115	118
4	37.5	7.43	46	119	116	153	4	37.5	7.42	46	99	118	135
5	37.2	7.40	44	122	104	155	5	37.1	7.43	40	134	105	130
6	37.7	7.41	43	107	105	140	6	37.7	7.35	50	93	97	110
Average	37.4	7.42	46	108	113	146	Average	37.4	7.40	46	107	114	127
S.D.	0.2	0.03	3	11	10	10	S.D.	0.3	0.03	5	15	13	11
2% H <sub>2</sub>						2% H <sub>2</sub>							
1	37.5	7.42	42	107	120	120	1	37.4	7.39	45	116	115	100
2	37.5	7.41	45	98	100	95	2	37.4	7.43	42	97	103	90
3	37.2	7.40	46	109	111	150	3	37.0	7.38	48	117	112	150
4	37.4	7.39	49	100	110	108	4	37.3	7.36	53	109	110	110
5	37.3	7.40	45	108	107	130	5	37.5	7.37	46	119	107	95
6	37.1	7.39	49	113	105	130	6	37.2	7.38	51	115	109	125
Average	37.3	7.40	46	106	109	122	Average	37.3	7.39	48	112	109	112
S.D.	0.2	0.01	3	6	7	19	S.D.	0.18	0.02	4	8	4	23
4% H <sub>2</sub>						4% H <sub>2</sub>							
1	37.4	7.39	49	103	111	140	1	37.1	7.43	37	142	107	125
2	37.3	7.36	49	93	96	120	2	37.4	7.29	41	133	96	112
3	37.4	7.39	46	90	92	135	3	37.5	7.39	47	93	90	135
4	37.4	7.41	45	113	96	145	4	37.4	7.39	45	134	100	130
5	37.1	7.43	45	107	98	140	5	37.1	7.40	44	138	100	125
6	37.3	7.42	44	120	97	150	6	37.1	7.40	47	143	94	140
Average	37.3	7.40	46	104	98	138	Average	37.3	7.38	44	131	98	128
S.D.	0.12	0.03	2	12	7	10	S.D.	0.19	0.05	4	19	6	10

© Copyright 2017 der deutschen Übersetzung by Andreas Zantop, Berlin im Auftrag der Echo Germany GmbH, www.echo-h2.de

Urheberrecht:

"Weitergabe sowie Vervielfältigung dieses Dokuments, Verwertung und Mitteilung seines Inhalts sind verboten, soweit nicht ausdrücklich gestattet. Zuwiderhandlungen verpflichten zu Schadenersatz. Alle Rechte vorbehalten."

Der Autor ist bestrebt, in allen Publikationen die Urheberrechte der verwendeten Texte zu beachten, von ihm selbst erstellte Texte zu nutzen oder auf lizenzfreie Texte zurückzugreifen. Sollte sich auf den jeweiligen Seiten dennoch eine ungekennzeichnete, aber durch fremdes Copyright geschützte Grafik, oder Text befinden, so konnte das Copyright vom Autor nicht festgestellt werden. Im Falle einer solchen unbeabsichtigten Copyrightverletzung wird der Autor das entsprechende Objekt nach Benachrichtigung aus seiner Publikation entfernen bzw. mit dem entsprechenden Copyright kenntlich machen.

Englisch: "The copying, distribution and utilization of this document as well as the communication of its contents to others without expressed authorization is prohibited. Offenders will be held liable for the payment of damages. All rights reserved."