

Wasserstoff-Wasser verstärkt die durch 5-Fluoruracil herbeigeführte Inhibition (Hemmung) von Darmkrebs

Joshua Runtuwene^{1,2}, Haruka Amitani¹, Marie Amitani¹, Akihiro Asakawa¹, Kai-Chun Cheng¹ und Akio Inui¹

¹Department of Psychosomatic Internal Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan

²Faculty of Medicine, Sam Ratulangi University, Manado, Indonesia

ZUSAMMENFASSUNG

Oxidativer Stress ist an der Entwicklung von Krebs beteiligt. Wasserstoff (H₂) ist ein sehr wirkungsvolles Antioxidans und weist entzündungs- und potenziell krebshemmende Eigenschaften auf. Diese Studie zielte darauf ab, die Rolle von Wasserstoff in Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) bei der Krebstherapie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter Verwendung der Colon-26-Zelllinie (maus-spezifische Dickdarmkrebszellen) zu untersuchen. Die Überlebensrate wurde mittels der Kaplan-Meier-Schätzung (Methode zur Analyse von Überlebenszeiten, bei denen nicht alle Individuen der gesamten Testdauer ausgesetzt sind) bestimmt, und die Zellviabilität (Zell-Überlebens-fähigkeit) wurde mittels eines Zellviabilitäts-Imaging-Kits (zur grafischen Darstellung) sowie des MTT-Assays (Test zur Bestimmung der Zellviabilität) untersucht. Die Aktivierung des Zell-Apoptose-Signalwegs (phosphorylierte Adenosin-monophosphat-aktivierte Proteinkinase (p-AMPK), Apoptose-induzierender Faktor (AIF) und Caspase 3) wurde mittels der Western-Blot-Analyse (Verfahren zur Übertragung (engl. Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran zwecks anschließender quantitativer Analyse) charakterisiert. (Apoptose: kontrollierter, durch Genexpression gesteuerter „Selbstmord“ der Zelle, der im Gegensatz zur Nekrose nicht die Freisetzung von Zellplasma einschließt und somit keine Entzündungsreaktion auslöst.) Die Verabreichung von Wasserstoff-Wasser erhöhte die Überlebensrate von Mäusen mit induzierten Colon-26-Krebszelllinien. Wasserstoff-Wasser verstärkte auch die Zell-Apoptose bei Krebszellen, was in einer deutlichen Erhöhung der Expression von p-AMPK, AIF und Caspase 3 in Colon-26-Zellen resultierte. Ebenso erhöhte Wasserstoff-Wasser den inhibitorischen (hemmenden) Effekt von 5-FU auf Colon-26-Zellen in Bezug auf die Zell-Überlebensrate und Antikrebs-Funktionen. Hoch wasserstoffreiches Wasser wies zudem eine stärkere antioxidative und Krebs hemmende Wirkung auf als Wasser mit einem natürlichen Wasserstoffgehalt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hoch wasserstoffreiches Wasser Darmkrebs unterbinden kann, vor allem in Kombination mit 5-Fluoruracil.

Themenbereiche: Zellbiologie, Diabetes und Endokrinologie, Ernährung, Onkologie, Atemwegsmedizin
Stichworte: Antioxidans, Wasserstoff, Krebs, Apoptose, 5-Fluoruracil

Einführung

Wasserstoff (H₂) ist ein Antioxidationsmittel, das im Stande ist, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu binden und zu neutralisieren (Ohta, 2012). Insbesondere reduziert Wasserstoff das Hydroxyl-Radikal (·OH, das am stärksten toxisch wirkende ROS) und Peroxynitrit (ONOO⁻). Langzeit-Exposition (dauerhafte Belastung) durch ROS als oxidativem Stress kann zur Entwicklung von Stoffwechselstörungen und verschiedenen Formen von Krebs führen (Casares et al., 2012; Meng & Zhao, 2012). Deshalb wurde darauf hingewiesen, dass Wasserstoff ein geeigneter Kandidat für bzw. beitragender Faktor zu therapeutischen Strategien bei verschiedenen Krankheiten sein könnte, einschließlich Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Hirngefäßerkrankungen, Stoffwechselstörungen (Aoki et al., 2012; Ghanizadeh & Berk, 2013; Iio et al., 2013; Nagatani et al., 2013; Nakao et al., 2010), Atemwegsstörungen und bestimmten Arten von Krebs (Kawai et al., 2012; Ning et al., 2013). Es hat sich herausgestellt, dass Wasserstoff als viel versprechendes Mittel zur Behandlung von Krebs, zur Vorbeugung oder in einer kombinierten Therapie mit Krebsmedikamenten / Antitumorsubstanzen eingesetzt werden

Zitierweise für diesen Artikel: Runtuwene et al. (2015), Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. *PeerJ* 3:e859; DOI 10.7717/peerj.859

Eingereicht am 2. Dezember 2014
 Angenommen am 6. März 2015
 Veröffentlicht am 7. April 2015

Korrespondenz-Autor
 Haruka Amitani,
 amitani@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp

Wissenschaftliche Redakteurin
 Lynnette Ferguson

Zusätzliche Informationen und Erklärungen können auf S. 12 gefunden werden

DOI 10.7717/peerj.859

© Copyright
 2015 Runtuwene et al.

Freigegeben unter der Creative Commons-Lizenz CC-BY 4.0

FREIER ZUGANG

kann. Die Einnahme von Wasserstoff-Wasser könnte die Nebenwirkungen von Krebsmedikamenten durch Verringerung von oxidativem Stress abschwächen und Metamorphosen aufgrund von verminderter Apoptose (die zu einem verlängerten Überleben von Tumorzellen führt) verringern (*Nakashima-Kamimura et al., 2009*). Wasserstoff verringert auch die negativen Auswirkungen radioaktiver Strahlung durch Schutz des Immunsystems (*Yang et al., 2012*). Wasserstoff könnte auch im Stande sein, die hämatologischen (Krankheiten des Blutes bzw. blutbildender Organe betreffenden) Strahlenschädigungen mittels Unterbindung der durch Strahlung induzierten Aktivierung von Caspase 3 zu lindern, zusätzlich zur Rettung weißer Blutkörperchen und Blutplättchen, die sonst durch Strahlung dezimiert werden (*Yang et al., 2012*). Es ist auch bekannt, dass Wasserstoff nicht die Wirkung von Krebsmedikamenten und Strahlentherapien mindert, und zwar weder *in vitro* noch *in vivo* (*Kang et al., 2011; Nakashima-Kamimura et al., 2009*). Obwohl schon von verschiedenen Seiten auf die Krebs hemmenden Eigenschaften von Wasserstoff hingewiesen wurde, müssen die genauen Wirkmechanismen dahinter noch genauer untersucht werden.

5-Fluoruracil (5-FU) ist das chemotherapeutische Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung von Darmkrebs aufgrund seines Einflusses auf den Kolorektal-Trakt (Bereich des Dick- und Enddarms) und seiner Fähigkeit, das Wachstum von Krebszellen durch Einbindung seiner Metaboliten (Zwischenprodukte von Stoffwechselfvorgängen) in die DNA und RNA (*Longley, Harkin & Johnston, 2003*) zu unterbinden. Es liegen Berichte vor, wonach dieser Wirkstoff eine hohe Wirksamkeit bei der Behandlung von soliden Tumoren und der Prävention von Lebermetastasen von Colon-26-Adenokarzinomzellen bei Mäusen aufweist. Die Kombination von 5-FU mit bestimmten Modalitäten (Ausführungsarten) der Krebsbehandlung, einschließlich Strahlentherapie und anderer Krebsmittel, verstärkt seine Krebs hemmenden Wirkungen (*Ishikawa et al., 1989; Tominaga et al., 1993*). Es gibt Hinweise darauf, dass eine verstärkte Wasserstoffbindung von Fluoruracil seine Wirksamkeit erhöht (*Kugimiya, Mukawa & Takeuchi, 2001*). Bei unserem Versuchsansatz, die Rolle hoch wasserstoffreichen Wassers („High-content Hydrogen Water“, HHW) in der Krebsbehandlung zu verstehen und nachzuvollziehen, untersuchten wir die Überlebensrate, das Ausmaß an Zell-Apoptose und einige andere Antikrebs-Parameter in einem Tiermodell zur Tumorkachexie (Stoffwechselstörung als Folge einer Krebserkrankung, hier durch Colon-26-induzierten Krebs bei Mäusen) (*Tanaka et al., 1990*), die mit hoch wasserstoffreichem Wasser (HHW) bzw. normal wasserstoffreichem Wasser („Natural Hydrogen Water“, NHW) und 5-FU behandelt wurden.

Materialien und Methoden

Zelllinie

Die Mäuse-Kolonkarzinom-Zelllinie (Colon-26) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia, USA) über Summit Pharmaceuticals Intl. Corp. (Tokio, Japan) erworben. Die Zellen wurden in einem von der ATCC formulierten Zellkulturmedium „RPMI-1640“, das mit fetalem Kälberserum (ein Hauptbestandteil vieler Nährmedien, die zur Aufzucht und Kultivierung von Zellen in der Zellkultur benötigt werden) ergänzt wurde, zu einer Endkonzentration von 10% kultiviert. Die Zellen wurden bei einer konstanten Temperatur von 37°C und in feuchter Atmosphäre von 5% CO₂ bis zu einem etwa 60%igen Zusammenfluss kultiviert. Daraufhin wurde das Medium gegen ein serumfreies Zellmedium ausgetauscht, das wahlweise 5-FU, HHW, NHW, 5-FU und HHW bzw. 5-FU und NHW enthielt (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd, Tokio, Japan). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen für weitere Studien gewonnen.

Tiere

Sechs Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse (ein aus der Hausmaus gezüchteter Albinostamm, der zu den am häufigsten in Tierversuchen verwendeten Labormäusen gehört) mit einem Gewicht von 19 bis 24 g wurden in einem pathogen-freien (frei von

Krankheitserregern) Umfeld und einem 12 Stunden Tag- /12 Stunden Nacht-Rhythmus bei kontrollierter Raumtemperatur im Animal Center der Kagoshima University (Kagoshima, Japan) gehalten. Die Tiere erhielten Futter und Leitungswasser ad libitum (nach Belieben). Zur Entwicklung von Krebszellen wurden 5×10^5 lebensfähige Colon-26-Zellen in 100 μ l RPMI-1640-Medium durch intraperitoneale Injektion (Injektion in die Bauchhöhle) injiziert ([Perboni et al., 2008](#)). Sämtliche in dieser Studie verwendeten Verfahren wurden vom Ethics Committee for Animal Care and Use der Kagoshima University (IRB-Zulassungsnummer MD13062) genehmigt und unter Befolgung der japanischen nationalen einheitlichen Richtlinien für Tierversuche der Kagoshima University durchgeführt.

Hoch wasserstoffreiches Wasser (HHW)

Hoch wasserstoffreiches Wasser (HHW) wurde in unserem Labor durch Lösung von H_2 in reinem Wasser und unter hohem Druck (0,4 MPa) für einen Zeitraum von 24 Stunden hergestellt, um eine allgemeine Wasserstoffgas-Sättigung von 0,8 mM zu erreichen. Zum Vergleich wurde in dieser Studie natürliches H_2 -Wasser (NHW) vom Mount Fuji (Yamanashi, Japan) mit einer Konzentration von 0,125 mM Wasserstoff (VanaH Co., Ltd., Yamanashi, Japan) ebenfalls verwendet.

Messung der Wasserstoffkonzentration

Wasserstoff-Wässer und Zelllinien

Wir nahmen eine Messung der Wasserstoffkonzentrationen vor, um eine angemessene Wasserstoffkonzentration zu gewährleisten, die im Stande ist, einen antioxidativen Effekt zu erzeugen. Beide Arten von Wasserstoff-Wasser (HHW und NHW) wurden in einem geschlossenen Glasgefäß (500 ml) aufbewahrt. Zelllinienschalen, die von der ATCC formuliertes RPMI-1640-Medium enthielten, wurden mit fetalem Kälberserum zu einer Endkonzentration von 10% ergänzt. Die Wasserstoffkonzentrationen wurden dann mit einer Wasserstoff-Messelektrode (DK-8200 Aarhus N; Unisense, Dänemark) wie zuvor beschrieben mit einigen Modifikationen gemessen ([Amitani et al., 2013](#)).

Tierversuchsreihen

Die Tiere wurden in fünf verschiedene Gruppen (5-FU, HHW, NHW, 5-FU und HHW und 5-FU und NHW) unterteilt. Jeder Gruppe wurden dann 0,6 ml Wasserstoff-Wasser (HHW und NHW) in den Magen der Maus unter Verwendung einer Schlundsonde zwangszugeführt. Zu jedem vorgegebenen Zeitpunkt (0, 2, 4, 6, 8 Stunden) wurde 150 μ l venöses Blut abgezapft und die Wasserstoffkonzentration mit der Messelektrode gemessen.

Messung der Zellviabilität

Zur qualitativen Bestimmung der Zellviabilität wurde das Live/Dead Cell Imaging Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) verwendet. Die „Live Green Solution“ (1 ml von 1 μ M) wurde in der „Dead Red Solution“ (1 mM lyophilisierter, d.h. gefriergetrockneter Bestand) gelöst. Colon-26-Zellen und HepG2-Zellen wurden eine Stunde lang mit zweimal der gleichen Menge Testlösung behandelt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden von den Zellen mikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Die Zellviabilität wurde ebenso mittels der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Analyse untersucht. Fünf Behandlungen (5-FU, HHW, NHW, 5-FU und HHW sowie 5-FU und NHW) wurden für einen Zeitraum von 24 Stunden an 10^4 Colon-26-Zellen in 96-Well-Platten (Platten mit 96 Vertiefungen zur Analyse von Zellkulturen) vorgenommen. Das Medium wurde dann ausgetauscht gegen 200 μ l pro Well freies Medium in jedem Well (endgültige Dosis für die 5-FU-Gruppe: 50 μ M). Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C bildeten die überlebenden Zellen dunkelblaue Formazan-Kristalle, und 0,01 M HCl/10% SDS wurde hinzugefügt. Der Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, California, USA) ein

System zur multiplen Analyse von Untersuchungsproben) wurde dann bei Wellenlängen von 570 und 600 nm zur Quantifizierung der Absorptionsrate eines jeden Wells wie zuvor beschrieben eingesetzt (Yu et al., 2012). Die Daten wurden nach dreimaliger Wiederholung der Experimente erfasst, um die Wiederholbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

In vivo- und in vitro-Experimente

In vivo: Nach Feststellung der Tumorinduktion (Tumorerzeugung) bei allen Gruppen mit Ausnahme der krebsfreien Gruppe von Mäusen, die Wasserstoff-Wasser tranken, wurden die Mäuse alle acht Stunden mit MQ-Wasser (Milli-Q Integral, ein System zur Aufbereitung von Rein- bzw. Reinstwasser), HHW bzw. NHW durch orale Verabreichung (250 µl) behandelt, und 5-FU wurde in einer 5%igen Glukoselösung (100 mg/kg) wöchentlich mittels intraperitonealer Injektion verabreicht (Perboni et al., 2008). 10 Tage nach der Tumorinduktion wurden die Mäuse letalisiert (getötet), und die Tumore wurden herausgeschnitten und skaliert. Mithilfe einer Schieblehre wurde die Tumorgroße bestimmt und nach der folgenden Gleichung berechnet: Länge × Breite² × 0,5, wie bereits zuvor beschrieben (Lee et al., 2012). In vitro A-Lösung mit 50 µl MQ, HHW (0,8 mM) bzw. NHW (0,125 mM) wurde jeder Objektträger-Kammer (IWAKI, Japan) hinzugefügt, und die Ergebnisse wurden mit den Objektträger-Kammern verglichen, denen nur 5-FU mit einer endgültigen Dosis von 50 µM hinzugefügt wurde.

Western-Blot-Analyse

Die Expression von p-AMPK, AIF und Caspase 3 wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Eisgekühlter RIPA- (Radio-Immuno-Precipitation Assay-) Puffer (ein Puffer zur Protein-Isolierung), ergänzt durch Phosphatase- und Protease-Inhibitoren (50 mM Natriumvanadat, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 2 mg/ml Aprotinin und 0,5 mg/ml Leupeptin) wurden für die Proteinextraktion und Eliminierung von Homogenaten und Zell-Lysaten verwendet. Die Proteinkonzentrationen wurden dann mit der BCA-Proteinbestimmung (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gemessen. Die Gesamtheit an Proteinproben (30 µg) wurde mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, 10% Acrylamid-Gel) unter Verwendung des Bio-Rad Trans-Blot-Systems gefiltert und anschließend auf Membranen übertragen. Die Membranen wurden mit 5% fettfreier Milch in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit 0,1% Tween 20 (TBS-T, ein in der Biochemie zur Lösung von Proteinen verwendeter Puffer) verblockt, für die Dauer von einer Stunde inkubiert, in TBS-T gewaschen und mit Primärantikörpern, die 16 Stunden lang in einer geeigneten Konzentrationen in TBS verdünnt wurden, hybridisiert. Anschließend wurden spezifische Antikörper für AMPK und p-AMPK (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA), AIF (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) und Caspase 3 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) verwendet. Zusätzlich wurden die Membranen mit sekundären Antikörpern inkubiert, um das β-Aktin (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) (1 : 5.000-Verdünnung), das als interne Kontrolle diente, zu binden. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern und der Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde unter Verwendung eines ECL-Kits (Enhanced Chemiluminescence Kit, Amersham Biosciences, Amersham, UK,) vorgenommen. Nach Vergleich mit dem Marker für Spezifität wurden die Immun-Blots von p-AMPK (62 kDa), AMPK (62 kDa), β-Aktin (43 kDa), AIF (57 kDa) und Caspase 3 (17 kDa) mit einem Laser-Densitometer quantifiziert.

Analyse der Neutralisierung freier Radikale

Die Fähigkeit von Wasserstoff, freie Radikale zu neutralisieren, wurde mittels einer 2,2-Diphenyl-1-Pikryl-Hydrazyl-Hydrat (DPPH)-Analyse zur fotometrischen Untersuchung der Radikalfänger-Eigenschaft bestimmt und mit der Aktivität von Vitamin C verglichen. 20 µl von jeder Probenlösung [0,01-1 mM Vitamin C (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland), 0,01-0,8 mM H₂ (HHW) und 0,0001-0,1 mM H₂ (NHW)] sowie 200 µl DPPH-Lö-

sung [2 mM 2,2-Diphenyl-1-Pikryl-Hydrazyl (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland), aufbereitet in Methanol] wurden jeder Mikroplatte hinzugefügt. Die Proben wurden dann 10 Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, und die Absorptionsrate (Ab) wurde unter Verwendung eines Mikroplatten-Readers bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die Radikalfänger-Eigenschaft wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet: % antioxidative Aktivität = $[12 (\text{Ab der Probe} / \text{Ab der Blindprobe})] \times 100$, wie bereits zuvor beschrieben (Amitani et al., 2013).

Statistische Analyse

Die Daten werden als durchschnittliche Standardabweichung (\pm SEM) in Bezug auf die Anzahl der Proben (n) in jeder Gruppe wiedergegeben. Die statistische Analyse wurde durch eine einfache und zweifache ANOVA-Varianzanalyse mit wiederholten Messungen vorgenommen. Der Tukey-Test (ein Signifikanztest aus der mathematischen Statistik) wurde zur Bestimmung signifikanter Abweichungen verwendet. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft. Die Überlebensraten wurden mit dem Kaplan-Meier-Verfahren analysiert, und die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Log-Rank-Tests (Test zum Vergleich von Überlebensraten in zwei oder mehr unverbundenen Stichproben) vorgenommen, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant eingestuft wurde.

Ergebnisse

Wasserstoff-Wasser erhöht die Überlebensrate von Mäusen mit Colon-26-Zellen

Die Überlebensrate in den Gruppen, die nur mit H₂-Wasser (HHW und NHW) behandelt wurde, war leicht erhöht im Vergleich zur Gruppe von Mäusen mit Colon-26-Zellen, die keine Behandlung mit Wasserstoff-Wasser erhalten hatte (Abb. 1A). Zudem war die Überlebensrate in der mit HHW behandelten Gruppe signifikant höher als in der mit NHW behandelten Gruppe (Abb. 1A). Nach Behandlung mit 5-FU erhöhte sich die Überlebensrate in signifikanter Weise (Abb. 1B). Die Kombination von HHW mit 5-FU resultierte in einer beträchtlich erhöhten Überlebensrate ($p < 0,05$), wohingegen die Kombination von NHW mit 5-FU weniger effektiv war (Abb. 1B). Während des gesamten Versuchszeitraums wurde die Wasseraufnahme überprüft und war über alle Gruppen hinweg in etwa dieselbe. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme wurden ebenfalls überwacht und waren in der Gruppe von Mäusen mit Colon-26-Zellen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Daten hier nicht wiedergegeben). Hinsichtlich der Wiedergewinnung des ursprünglichen Körpergewichts wurden jedoch keine signifikanten Abweichungen zwischen der Gruppe, die mit Wasserstoff-Wasser behandelt wurde, und der Kontrollgruppe festgestellt (Daten hier nicht wiedergegeben). In der 5-FU-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verringerung der Tumorgroße und des Tumorgewichts (Abb. 1C und 1D).

Wasserstoff-Verringerungsrate in vitro und in vivo

Die Wasserstoffkonzentrationen wurden über einen Zeitraum von acht Stunden gemessen (Abb. 2A–2C). Frisch zubereitetes HHW zeigte eine maximale H₂-Konzentration von etwa 0,8 mM, wohingegen NHW eine H₂-Konzentration von 0,1 mM beibehielt (Abb. 2A). In Zellkulturmedien erreichte die H₂-Konzentration von HHW ein Maximum von 0,3 mM, wohingegen NHW eine Maximalkonzentration von etwa 70 μ M erreichte (Abb. 2B). In den Körpern der Mäuse erreichte die Wasserstoffkonzentration in der Spitze 6 μ M bei der HHW-Gruppe und 4 μ M bei der NHW-Gruppe (Abb. 2C).

Wasserstoff-Wasser verstärkt den apoptotischen Effekt von 5-FU auf Krebszellen

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 5-FU, Wasserstoff-Wasser (HHW, NHW) bzw. einer Kombination von 5-FU mit Wasserstoff-Wasser wurde die Zellviabilität der Colon-

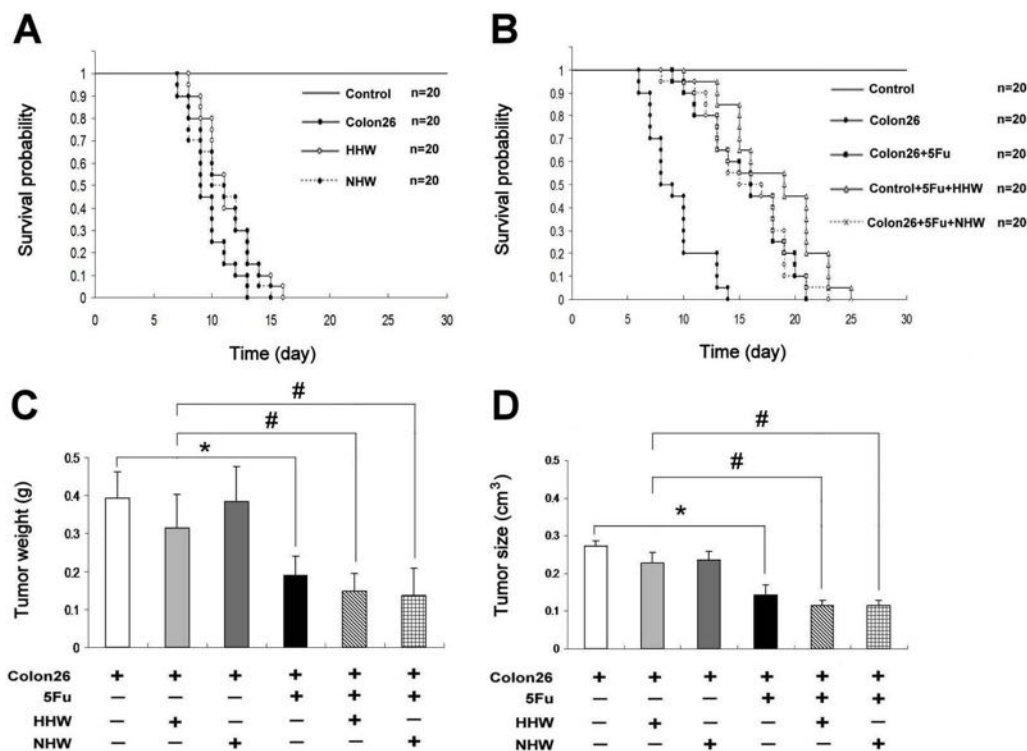


Abb. 1: Kaplan-Meier. Die Überlebensrate in der HHW-Gruppe war im Vergleich zur NHW-Gruppe leicht erhöht. Die Zugabe von 5-FU am Tag 14 prolongierte (verlängerte zeitlich) die Überlebensraten ($P < 0,05$) von Mäusen mit Colon-26-Zellen. Die Kombination von HHW und 5-FU brachte die längste Überlebensrate hervor, gefolgt von der Kombination von NHW und 5-FU und 5-FU-Therapie allein. Das Ergebnis des Log-Rank-Tests: für Colon-26 und HHW, $P < 0,05$ (Fig. 1A); für Colon-26 und 5-FU, $P < 0,001$; für Colon-26 und 5-FU und HHW, $P < 0,001$; für Colon-26 und 5-FU und NHW, $P < 0,001$, und für Colon-26 und 5-FU sowie Colon-26 und 5-FU und HHW, $P < 0,05$. Tumorgroße und -gewicht werden in Abb. 1C und 1D wiedergegeben. Bei der 5-FU-Gruppe fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verringerung sowohl beim Tumorgewicht als auch bei der Tumorgroße ($n = 7$, $*p < 0,05$). In ähnlicher Weise zeigte sich eine weitere Verringerung bei Tumorgewicht und Tumorgroße bei den mit H₂ behandelten Gruppen mit den Kombinationen 5-FU und HHW sowie 5-FU und NHW ($n = 7$, $#p < 0,05$).

26-Zellen untersucht. Wie in Abb. 3 wiedergegeben, hatte die Kombination aus 5-FU und HHW den stärksten apoptotischen Effekt auf Colon-26-Zellen, gefolgt von der Kombination aus 5-FU und NHW. Die Verabreichung von H₂-Wasser (HHW und NHW) resultierte in einer Abnahme der Viabilität der Colon-26-Zellen, doch der Wirkungsgrad war niedriger als bei der Behandlung mit 5-FU.

Die Zellviabilität von Colon-26-Zellen wurde dann mittels des MTT-Tests geprüft (Abb. 4A). Sämtliche Behandlungen mit jedem Wirkstoff (5-FU, HHW, NHW) waren in dieser Versuchsreihe im Vergleich zur Kontrollgruppe effektiv bei der Verringerung der Zellviabilität von Colon-26-Zellen. In Bezug auf jeden Wirkstoff für sich allein war die Behandlung mit 5-FU die effektivste, gefolgt von HHW und NHW. In Kombination der Wirkstoffe untereinander resultierte die Kombination von HHW mit 5-FU in einer stark ausgeprägten Zell-Apoptose bei Colon-26-Zellen, und NHW in Kombination mit 5-FU brachte ein ähnliches Ergebnis hervor. Auf HepG2-Zellen hatte Wasserstoff jedoch keine statistisch signifikanten Auswirkungen (Abb. 4B).

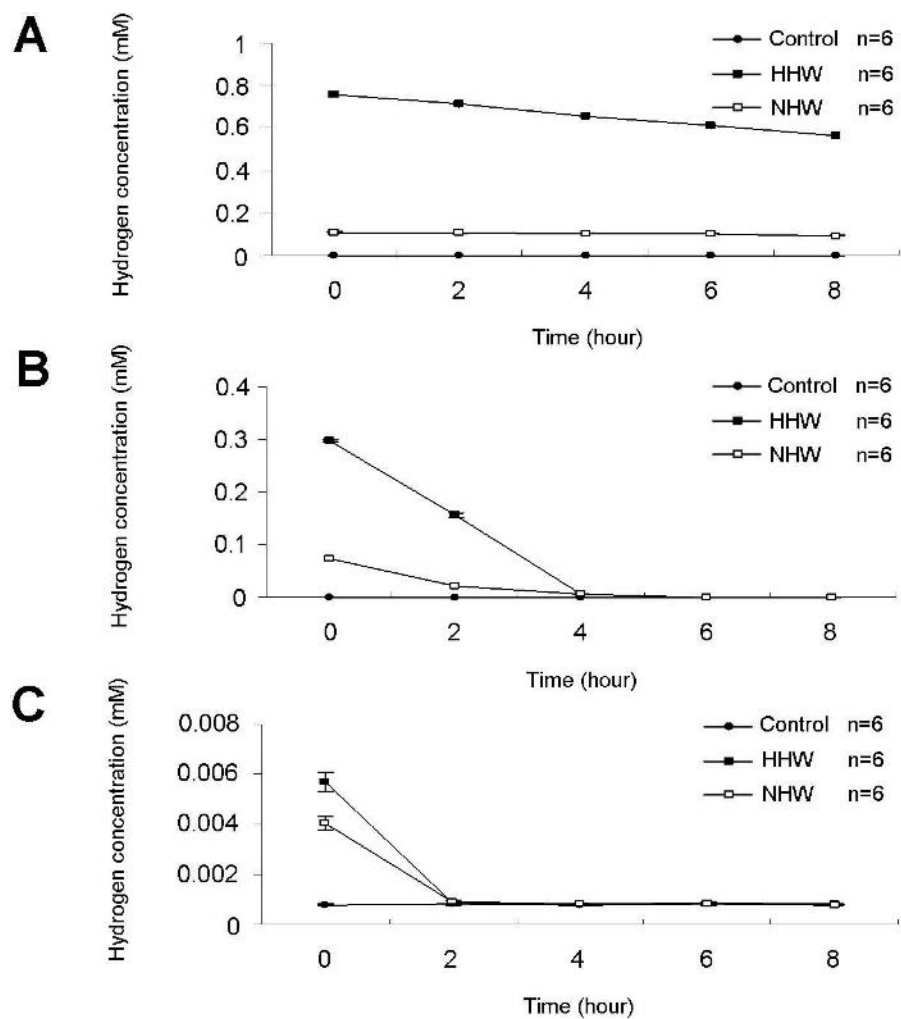


Abb. 2: Die Wasserstoffkonzentration bei den drei Behandlungsarten (HHW, NHW und Kontrollgruppe) über einen Zeitraum von 8 Stunden. (A) Direkte Überprüfung der H₂-Konzentrationen in jedem Behälter, (B) H₂-Konzentrationen beim in vitro-Experiment, und (C) H₂-Konzentrationen beim in vivo-Experiment, gemessen im Blut nach direkter Katheterisierung (Legen bzw. Einführen eines Katheters in ein Hohlorgan) von Wasserstoff-Wasser in den Magen des Tieres.

HHW übt eine stärker antioxidative Wirkung aus als NHW

Die Überprüfung der antioxidativen Wirkung, gemessen an der Neutralisierung bzw. dem Abfangen freier Radikale (DPPH), zeigte auf, dass sowohl HHW (0,01 und 0,8 mM) als auch NHW (0,01 und 0,1 mM) antioxidativ wirkten (Abb. 5). Zusätzlich zeigte sich, dass HHW eine stärker antioxidative Wirkung als NHW ausübte und der antioxidativen Wirkung von Vitamin C (1 mM) nahekam. Bei jeder Maximaldosis übte Vitamin C (1,0 mM) die stärkste antioxidative Wirkung aus, gefolgt von HHW (0,8mM) und NHW (0,1mM). Im Mol/Mol-Vergleich ist jedoch die Stärke des antioxidativen Effekts von HHW (0,1mM) und NHW (0,1 mM) dieselbe.

Bestimmung der Zell-Apoptose in Colon-26-Zellen mittels p-AMPK-, AIF- und Caspase 3-Expression

Die Expression von p-AMPK, AIF und Caspase 3 in Colon-26-Zellen war nach der Behandlung mit beiden Arten von Wasserstoff-Wasser (HHW und NHW) erhöht. Die Ex-

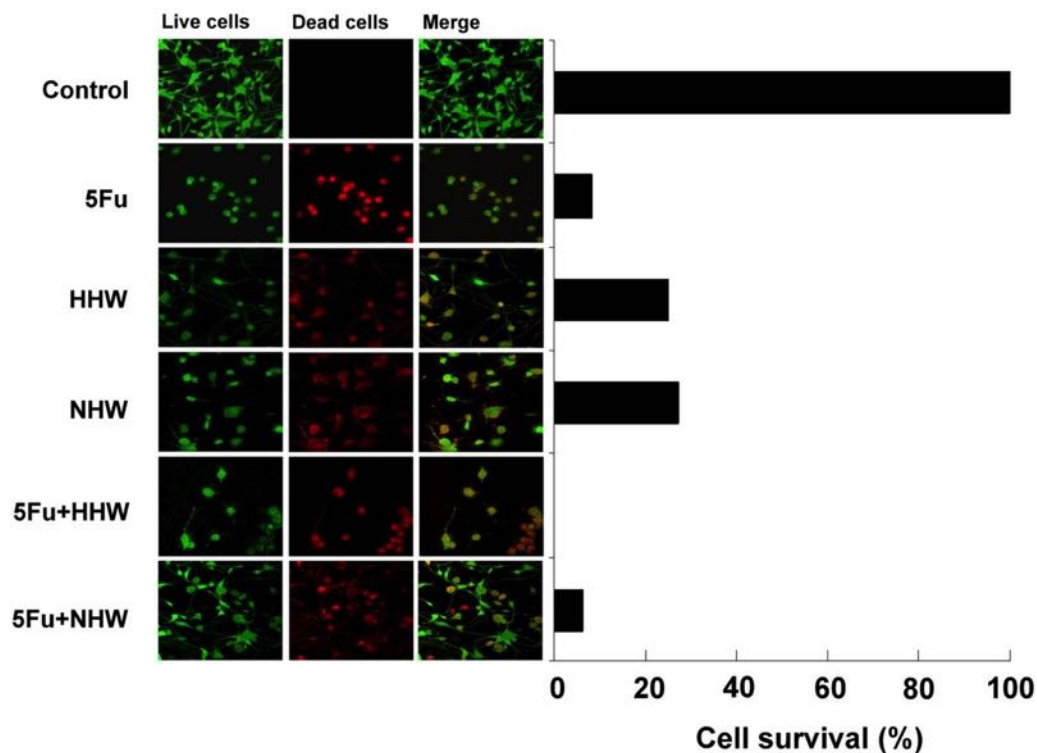


Abb. 3: Zellviabilität von Colon-26-Zellen 4 Stunden nach der Behandlung mit 5-FU, HHW, NHW, 5-FU und HHW sowie 5-FU und NHW. Die Verabreichung von 5-FU führte zu einer Verringerung der Viabilität von Colon-26-Zellen; H₂-Wasser (HHW und NHW) verringerte die Viabilität ebenfalls, jedoch in einem geringeren Ausmaß. Die kombinierte Behandlung mit 5-FU und HHW hatte den stärksten Zell-Apoptose-Effekt auf Colon-26-Zellen, gefolgt von einer Kombination aus 5-FU und NHW.

pressionen dieser Proteine in Colon-26-Zellen erhöhte sich bei der kombinierten Behandlung mit 5-FU noch weiter, wie in Abb. 6 wiedergegeben.

Diskussion

Gewöhnlich erfordert die Verabreichung von Wasserstoff mittels Inhalation einen professionellen Techniker und spezielle Ausrüstung (Huang et al., 2010; Zhang et al., 2012). Die Verabreichung von Wasserstoff als Gas gelöst in Wasser ist jedoch einfacher und erfordert keine anspruchsvollen Geräte (Zhang et al., 2012), und ihre Effektivität und Wirkung ist der Inhalation ähnlich (Shimouchi et al., 2013). Wasserstoff-Wasser ist zudem aufgrund seiner einfachen Herstellung und der Tatsache, dass es dem menschlichen Körper ohne Sicherheitsrisiko zugeführt werden kann, der Inhalationsmethode vorzuziehen. Deshalb ist Wasserstoff-Wasser in der Anwendung bequemer und unkomplizierter als die Inhalation, vor allem in der präventiven Pflege. Diese Art der Anwendung ist auch für ambulante Patienten einfach auszuführen. In dieser Studie übernahmen wir die allgemein verbreitete Methode, Wasserstoff-Wasser unter Verwendung der Hochdruck-Vakuum-Methode wie zuvor beschrieben herzustellen (Karthikkumar et al., 2012; Zeng et al., 2014; Zhang et al., 2012). Andere Methoden wie etwa die Verwendung von metallischen Magnesiumstäben und die Elektrolyse von basischem Wasser (Nakao et al., 2010; Qin et al., 2012; Zeng et al., 2014), sind ebenfalls im Stande, eine angemessene Wasserstoff-Sättigung zu erzielen. Es können also viele verschiedene Methoden zur Anwendung kommen, je nach individuellen Vorlieben und Verfügbarkeit. Die große Herausforderung bei der Herstellung von Wasserstoff-Wasser ist die Bewahrung der Wasserstoff-Ionen in der Lösung, da sich die Anzahl der Wasserstoff-

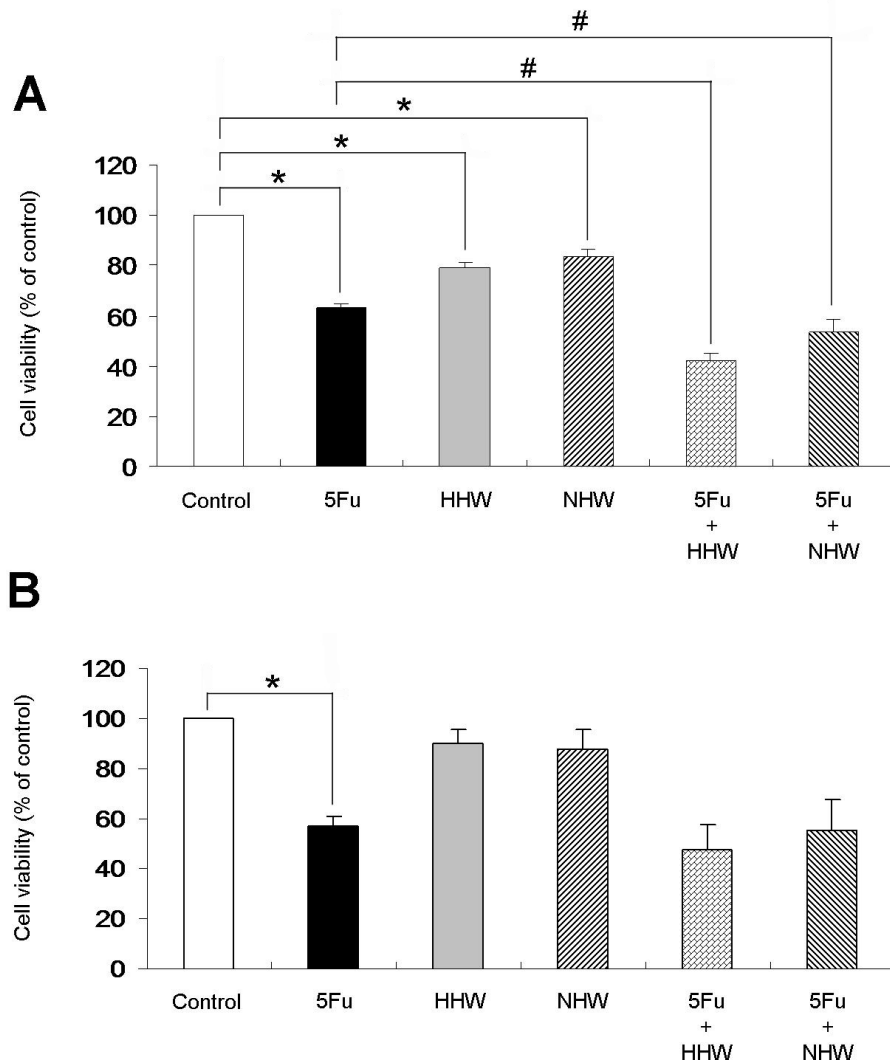


Abb. 4: Zellviabilität von Colon-26- (A) und HepG2-Zellen (B) wurde mittels MTT-Test gemessen. Die Zellviabilität von Colon-26-Zellen zeigte eine signifikante Verringerung ($p < 0,05$) bei allen Behandlungsgruppen (5-FU, HHW, NHW) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die stärkste signifikante Verringerung ergab die Behandlung mit 5-FU, gefolgt von HHW und NHW. Die Therapiekombination von 5-FU und HHW oder NHW verringerte die Zellviabilität ($p < 0,05$) relativ zu HHW allein. 5-FU, nicht jedoch H_2 , verringerte die Zellviabilität von HepG2-Zellen.

lonen aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Gases kontinuierlich verringert (*Kajiyama et al., 2008*). Anders als bei verschiedenen anderen Methoden, die entwickelt wurden, um dieses Problem zu lösen (*Kang et al., 2011; Nakao et al., 2010; Ohta, 2011*), beschlossen wir bei dieser Studie, Wasserstoff-Wasser auf einer täglichen Basis neu und frisch herzustellen. In Übereinstimmung mit einem bereits zuvor veröffentlichten Bericht (*Nagata et al., 2009*) resultierte die Verabreichung von Wasserstoff in einer Konzentration von 0,8 mM (HHW) über den Magen in Wasserstoff-Blutkonzentrationen von etwa 6 μM , wohingegen die Verabreichung von 0,1 mM (NHW) überraschenderweise in Wasserstoffkonzentrationen im Blut von bis zu 4 μM resultierte. Die Ähnlichkeit dieser Werte könnte das Ergebnis einer Supplementierung von Salzen wie etwa Natriumchlorid sein, die, so wird angenommen, zu einer anhaltenden Sättigung des Wassers mit Wasserstoffgas beiträgt (*Amitani et al., 2013*). Sowohl HHW als auch NHW ergaben also angemessene Konzentrationen von Wasserstoff in vivo.

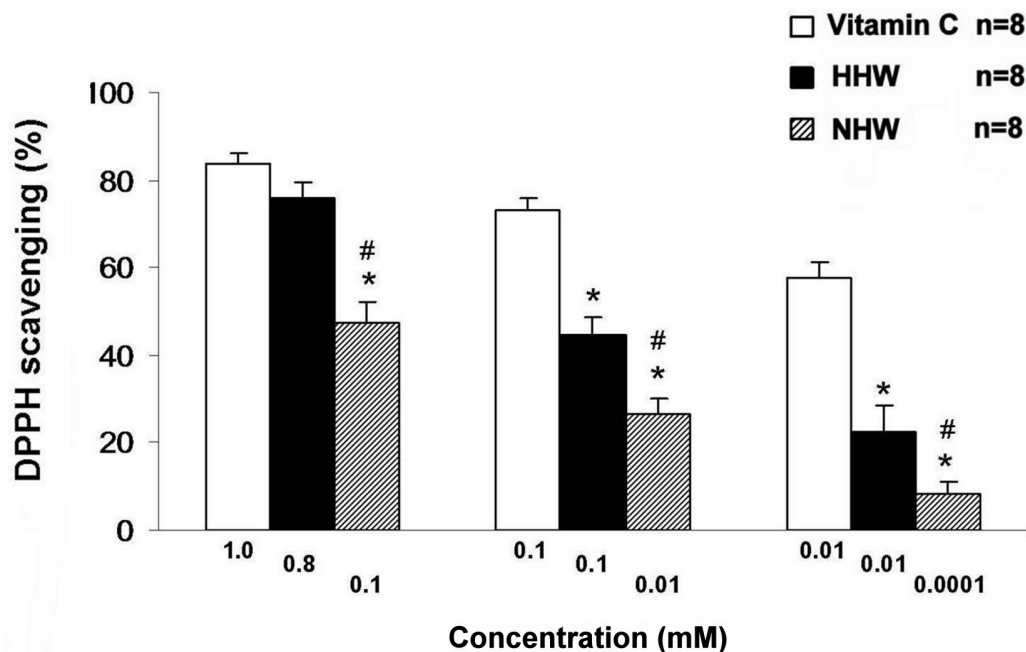


Abb. 5: Die freie Radikalfänger-Eigenschaft (DPPH) von HHW und NHW im Vergleich zu Vitamin C bei verschiedenen Dosierungskonzentrationen. *p < 0,05 für die Differenz zwischen Vitamin C und HHW. #p < 0,05 für die Differenz zwischen Vitamin C und NHW.

Wie in den Überlebenskurven wiedergegeben, kam es bei einer Behandlung mit H₂-Wasser allein nicht zu einer Verlängerung der Überlebensraten krebsbelasteter Mäuse, obgleich ein Trend hin zu einer verbesserten Überlebensrate festgestellt werden konnte (Abb. 1). 5-FU wurde in dieser Studie verwendet, weil es ein antimetabolisches Medikament ist, das zur klinischen Behandlung von (Dick)darmkrebs eingesetzt wird (Mhaidat, Bouklichacene & Thorne, 2014). 5-FU übt durch Inhibition der Thymidylat-Synthase (TS, ein für das Krebswachstum wichtiges Enzym) und Integration ihrer Metaboliten in RNA und DNA Krebs hemmende Wirkeigenschaften aus (Longley, Harkin & Johnston, 2003). 5-FU ist auch ein effektiver Wirkstoff für die singuläre oder kombinierte Behandlung solider Tumore und für die Prävention von Leber-Metastasen von Colon-26-Adenokarzinom-Zellen in Mäusen (Ishikawa et al., 1989; Tominaga et al., 1993). Die Hinzufügung von 5-FU resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate, und die Therapiekombination von 5-FU und H₂ führte zu einer noch stärker signifikanten Verbesserung der Überlebensraten.

Bei niedrigeren Dosierungen können Antioxidantien eine Schutzwirkung auf die Zellen, einschließlich Krebszellen, ausüben, und zwar hauptsächlich durch ihre Radikalfänger-Eigenschaften. Höhere Dosierungen befähigen Antioxidantien jedoch zu einer Krebszellen-Apoptose oder allgemein einer verbesserten Apoptose, vermutlich durch einen Überschuss an freien Radikalen (Nakashima-Kamimura et al., 2009; Oberley & Oberley, 1997; Simone et al., 2007a; Simone et al., 2007b). Ähnliche Wirkeigenschaften konnten beim Einsatz von Ascorbinsäure (Vitamin C) festgestellt werden. Die Behandlung mit beiden Arten von H₂-Wässern (HHW und NHW) erhöhte die Expression von p-AMPK, AIF und Caspase 3 in Colon-26-Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass H₂-Wasser durch Vermittlung des AMPK-Signalwegs in Colon-26-Zellen zu einer Zell-Apoptose führte. Die Phosphorylierung von AMPK scheint beim apoptotischen Effekt von H₂-Wasser in Colon-26-Zellen beteiligt zu sein, die in der Folge die Caspase-abhängigen Apoptose-Signalwege über Caspase 3 und DNA-Abbau über AIF aktiviert, wie be-

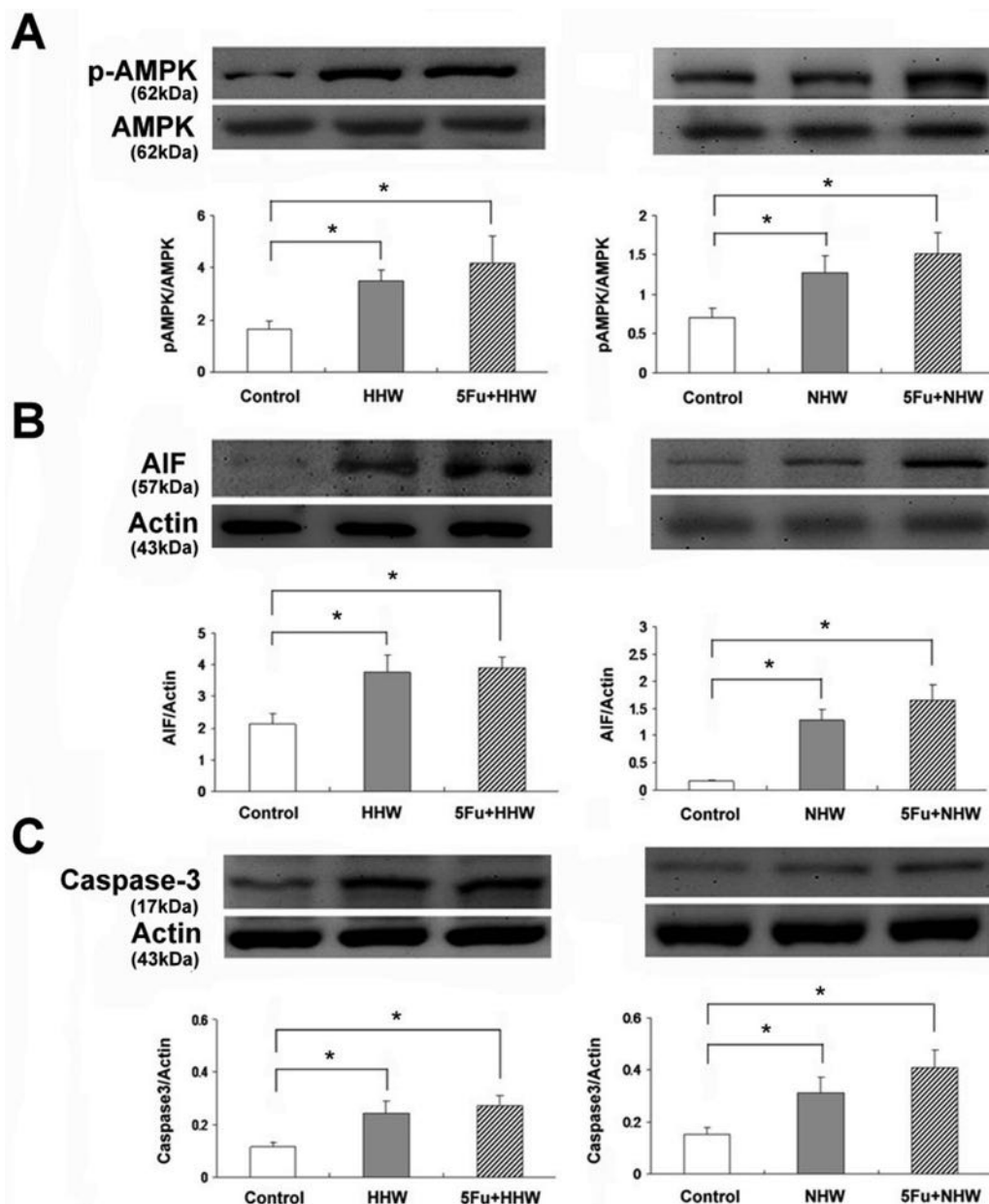


Abb. 6: Western-Blot-Analysen von p-AMPK, AIF und Caspase 3 für Zell-Apoptose in Colon-26-Zellen nach Behandlung mit HHW oder NHW und in Kombination mit 5-FU. Die Expression von p-AMPK, AIF und Caspase 3 zeigte nach Behandlung mit beiden Arten von H₂-Wasser (HHW und NHW) eine signifikante Erhöhung. Die Konzentrationen aller untersuchten Proteine erhöhten sich durch Zugabe von 5-FU. Nach der Behandlung mit HHW ließ sich ein höherer Grad an Expression nachweisen als nach der Behandlung mit NHW.

reits zuvor beschrieben (Jin & Reed, 2002). Obgleich bei der Apoptose viele Signalaktivitäten beteiligt sind (Strasser, O'Connor & Dixit, 2000), steht die durch H₂ vermittelte Zell-Apoptose in Colon-26-Krebszellen in einem direkten Verhältnis zum AMPK-Signalweg.

H₂ verstärkte den Krebs hemmenden Effekt von 5-FU in vivo, was bisher noch nicht nachgewiesen wurde. Die Therapiekombination von H₂-Wasser mit 5-FU erwies sich als effektiver gegen Colon-26-Krebszellen, und zwar sowohl in vivo als auch in vitro. Der Grund für diesen erhöhten Wirkungsgrad könnten die einzigartigen, sich nicht über-

schneidenden Mechanismen der beiden beteiligten Wirkstoffe sein. Wasserstoff kann auch als ROS-Radikalfänger agieren und diejenigen freien Radikale neutralisieren, die nebenbei vom Tumor erzeugt werden, was über den Caspase-unabhängigen Signalweg und Lipid-Peroxidation zum Zelltod führt (Farmer & Mueller, 2013). 5-FU wirkt ausschließlich durch Beeinträchtigung bzw. Störung des Prozesses der DNA- und RNA-Produktion in Colon-26-Zellen (De Angelis et al., 2006; Longley, Harkin & Johnston, 2003). Aus diesem Grund kann die Behandlung mit H₂ die Wirkung von 5-FU verstärken, um die Überlebensrate von Mäusen mit Colon-26-Zellen zu erhöhen und die Krebs hemmenden Eigenschaften von 5-FU in kultivierten Colon-26-Zellen zu verstärken. Die Verabreichung von HHW resultierte auch in antioxidativen Effekten, einer signifikant höheren Zell-Apoptoserate und einer signifikant höheren Wirksamkeit von 5-FU im Vergleich zur Behandlung mit NHW. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die höhere H₂-Sättigung in HHW (etwa 0,8 mM) im Vergleich zu NHW (etwa 0,1mM) zurückzuführen.

Diese Studie ist in ihrer allgemeinen Gültigkeit insofern begrenzt, als dass wir uns hier auf eine spezifische Art von Krebszelle konzentriert haben. Wir waren nicht im Stande, einen signifikanten Effekt von H₂ in HepG2-Krebszellen nachzuweisen. Eine Untersuchung weiterer Darm- und anderer Arten von Krebszellen ist erforderlich, um die genauen Mechanismen und Wirkungen von H₂ bei verschiedenen Arten von Krebs zu studieren.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die hier zusammengetragenen Daten nahelegen, dass Wasserstoff-Wasser im Stande ist, eine Zell-Apoptose herbeizuführen und somit die Krebs hemmenden Eigenschaften von 5-FU in Colon-26-Zellen sowohl in vivo als auch in Vitro zu verstärken, und dass diese Effekte von Wasserstoff-Wasser von der jeweiligen Wasserstoffkonzentration abhängig sind.

Danksagung

Wir danken der VanaH Co., Ltd. für die tägliche Versorgung mit frischem natürlichem Wasserstoff-Wasser und der Unterstützung dieses Studienprojekts.

Zusätzliche Informationen und Erklärungen

Finanzielle Fördermittel

Diese Studie wurde zum Teil von der VanaH Co., Ltd. finanziell gefördert. Die Geldgeberin spielte beim Studiendesign, bei der Datenerfassung und -analyse, bei der Entscheidung zur Veröffentlichung dieser Studie sowie bei der Vorbereitung des Manuskripts keine Rolle.

Offenlegung von Fördergeldern

Die folgenden Informationen zu Fördermitteln wurden von den Autoren offengelegt: VanaH Co., Ltd.

Konkurrierende Interessen

Die VanaH Co., Ltd. sorgte für die tägliche Versorgung mit frischem natürlichem Wasserstoff-Wasser und der Unterstützung dieses Studienprojekts.

Autorenbeiträge

- Joshua Runtuwene führte die Experimente aus, analysierte die Daten und verfasste das Studienpapier.
- Haruka Amitani konzipierte und entwarf die Experimente und überarbeitete den Entwurf des Studienpapiers.

- Marie Amitani erstellte die Abbildungen und/oder Tabellen.
- Akihiro Asakawa führte die Experimente aus.
- Kai-Chun Cheng konzipierte und entwarf die Experimente, führte die Experimente aus, analysierte die Daten, unterstützte die Studie mit Reagenzien, Materialien und Analysen, erstellte die Abbildungen und/oder Tabellen und beteiligte sich an der Erstellung und Überarbeitung der Entwürfe des Studienpapiers.
- Akio Inui konzipierte und entwarf die Experimente und beteiligte sich an der Erstellung sowie Überarbeitung der Entwürfe des Studienpapiers.

Tier-Ethik

Die folgenden Informationen wurden im Zusammenhang mit ethischen Zulassungen (d.h. Zulassungsstelle und etwaige Referenznummern) geliefert: Ethics Committee for Animal Care and Use of Kagoshima University (MD13062).

Zusätzliche Informationen

Zusätzliche Informationen zu diesem Artikel sind online erhältlich unter:
<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.859#supplemental-information>.

Quellenangaben

- Amitani H, Asakawa A, Cheng K, Amitani M, Kaimoto K, Nakano M, Ushikai M, Li Y, Tsai M, Li JB, Terashi M, Chaolu H, Kamimura R, Inui A. 2013.** Hydrogen improves glycemic control in type1 diabetic animal model by promoting glucose uptake into skeletal muscle. *PLoS ONE* 8:e53913 DOI [10.1371/journal.pone.0053913](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053913).
- Aoki K, Nakao A, Adachi T, Matsui Y, Miyakawa S. 2012.** Pilot study: effects of drinking hydrogen-rich water on muscle fatigue caused by acute exercise in elite athletes. *Medical Gas Research* 2:12–17 DOI [10.1186/2045-9912-2-12](https://doi.org/10.1186/2045-9912-2-12).
- Casares C, Ramirez-Camacho R, Trinidad A, Roldan A, Jorge E, Garcia-Berrocal JR. 2012.** Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 269:2455–2459 DOI [10.1007/s00405-012-2029-0](https://doi.org/10.1007/s00405-012-2029-0).
- De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, Stokke T. 2006.** Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Molecular Cancer* 5:20–44 DOI [10.1186/1476-4598-5-20](https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-20).
- Farmer EE, Mueller MJ. 2013.** ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* 64:429–450 DOI [10.1146/annurev-arplant-050312-120132](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120132).
- Ghanizadeh A, Berk M. 2013.** Molecular hydrogen: an overview of its neurobiological effects and therapeutic potential for bipolar disorder and schizophrenia. *Medical Gas Research* 3:11–16 DOI [10.1186/2045-9912-3-11](https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-11).
- Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. 2010.** Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free Radical Research* 44:971–982 DOI [10.3109/10715762.2010.500328](https://doi.org/10.3109/10715762.2010.500328).
- Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K. 2013.** Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating CD36 expression in HepG2 cells. *Medical Gas Research* 3:6–12 DOI [10.1186/2045-9912-3-6](https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-6).
- Ishikawa T, Tanaka Y, Ishitsuka H, Ohkawa T. 1989.** Comparative antitumor activity of 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in combination with radiation therapy in mice bearing colon 26 adenocarcinoma. *Japanese Journal of Cancer Research* 80:583–591 DOI [10.1111/j.1349-7006.1989.tb01679.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1989.tb01679.x).
- Jin C, Reed JC. 2002.** Yeast and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:453–459 DOI [10.1038/nrm832](https://doi.org/10.1038/nrm832).
- Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. 2008.** Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutrition Research* 28(3):137–143 DOI [10.1016/j.nutres.2008.01.008](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.01.008).

- Kang KM, Kang YN, Choi IB, Gu Y, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. 2011.** Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors. *Medical Gas Research* 1:11–18 DOI [10.1186/2045-9912-1-11](https://doi.org/10.1186/2045-9912-1-11).
- Karthikkumar V, Sivagami G, Vinothkumar R, Rajkumar D, Nalini N. 2012.** Modulatory efficacy of rosmarinic acid on premalignant lesions and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34:949–958 DOI [10.1016/j.etap.2012.07.014](https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.07.014).
- Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. 2012.** Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56:912–921 DOI [10.1002/hep.25782](https://doi.org/10.1002/hep.25782).
- Kugimiya A, Mukawa T, Takeuchi T. 2001.** Synthesis of 5-fluorouracil-imprinted polymers with multiple hydrogen bonding interactions. *Analyst* 126:772–774 DOI [10.1039/b010056k](https://doi.org/10.1039/b010056k).
- Lee B, Lee DY, Yo KH, Baek NI, Park JH, Chung IS. 2012.** Calenduloside E 6'-methyl ester induces apoptosis in CT-26 mouse colon carcinoma cells and inhibits tumor growth in a CT-26 xenograft animal model. *Oncology Letters* 4(1):22–28.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 2003.** 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 3:330–338 DOI [10.1038/nrc1074](https://doi.org/10.1038/nrc1074).
- Meng JX, Zhao MF. 2012.** Reactive oxygen species and fibrosis in tissues and organs—review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 20:1284–1288.
- Mhaidat NM, Bouklihacene M, Thorne RF. 2014.** 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C-delta. *Oncol Lett* 8:899–704.
- Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. 2009.** Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34:501–508 DOI [10.1038/npp.2008.95](https://doi.org/10.1038/npp.2008.95).
- Nagatani K, Nawashiro H, Takeuchi S, Tomura S, Otani N, Osada H, Wada K, Katoh H, Tsuzuki N, Mori K. 2013.** Safety of intravenous administration of hydrogen-enriched fluid in patients with acute cerebral ischemia: initial clinical studies. *Medical Gas Research* 3:13–19 DOI [10.1186/2045-9912-3-13](https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-13).
- Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. 2010.** Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome—an open label pilot study. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 46:140–149 DOI [10.3164/jcfn.09-100](https://doi.org/10.3164/jcfn.09-100).
- Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. 2009.** Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64:753–761 DOI [10.1007/s00280-008-0924-2](https://doi.org/10.1007/s00280-008-0924-2).
- Ning Y, Shang Y, Huang H, Zhang J, Dong Y, Xu W, Li Q. 2013.** Attenuation of cigarette smoke-induced airway mucus production by hydrogen-rich saline in rats. *PLoS ONE* 8:e83429 DOI [10.1371/journal.pone.0083429](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083429).
- Oberley TD, Oberley LW. 1997.** Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histology and Histopathology* 12:525–535.
- Ohta S. 2011.** Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Current Pharmaceutical Design* 17:2241–2252 DOI [10.2174/138161211797052664](https://doi.org/10.2174/138161211797052664).
- Ohta S. 2012.** Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica ACTA/General Subjects* 1820:586–594 DOI [10.1016/j.bbagen.2011.05.006](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.006).
- Perboni S, Bowers C, Kojima S, Asakawa A, Inui A. 2008.** Growth hormone releasing peptide 2 reverses anorexia associated with chemotherapy with 5-fluorouracil in colon cancer cell-bearing mice. *World Journal of Gastroenterology* 14:6303–6305 DOI [10.3748/wjg.14.6303](https://doi.org/10.3748/wjg.14.6303).
- Qin ZX, Yu P, Qian DH, Song MB, Tan H, Yu Y, Li W, Wang H, Liu J, Wang Q, Sun XJ, Jiang H, Zhu JK, Lu W, Huang L. 2012.** Hydrogen-rich saline prevents neointima formation after carotid balloon injury by suppressing ROS and the TNF- α /NF- κ B pathway. *Atherosclerosis* 220:343–350 DOI [10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.002).

- Shimouchi A, Nose K, Mizukami T, Che DC, Shirai M. 2013.** Molecular hydrogen consumption in the human body during the inhalation of hydrogen gas. *Advances in Experimental Medicine and Biology: Oxygen Transport to Tissue* 789:315–321 DOI [10.1007/978-1-4614-7411-1_42](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7411-1_42).
- Simone 2nd CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. 2007a.** Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 13:22–28.
- Simone 2nd CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. 2007b.** Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 13:40–47.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000.** Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* 69:217–245 DOI [10.1146/annurev.biochem.69.1.217](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.217).
- Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, Udagawa T, Ishikawa T, Horii I, Ishitsuka H, Kataoka T, Taguchi T. 1990.** Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice. *Cancer Research* 50:2290–2295.
- Tominaga T, Yoshida Y, Kosaki G, Kurihara M. 1993.** Effect of 5-fluorouracil and UFT on experimental liver metastasis model of colorectal cancer using mouse colon 26 cells. *Japanese Journal of Cancer Research* 84:783–786 DOI [10.1111/j.1349-7006.1993.tb02044.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1993.tb02044.x).
- Yang Y, Li B, Liu C, Chuai Y, Lei J, Gao F, Cui J, Sun D, Cheng Y, Zhou C, Cai J. 2012.** Hydrogen-rich saline protects immunocytes from radiation-induced apoptosis. *Medical Science Monitor* 18:BR144–BR148.
- Yu HC, Chen LJ, Cheng KC, Li YX, Yeh CH, Cheng JT. 2012.** Silymarin inhibits cervical cancer cell through an increase of phosphatase and tensin homolog. *Phytotherapy Research* 26:709–715 DOI [10.1002/ptr.3618](https://doi.org/10.1002/ptr.3618).
- Zeng K, Huang H, Jiang XQ, Chen XJ, Huang W. 2014.** Protective effects of hydrogen on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 45:39–42.
- Zhang JY, Liu C, Zhou L, Qu K, Wang R, Tai MH, Lei JC, Wu QF, Wang ZX. 2012.** A review of hydrogen as a new medical therapy. *Hepatogastroenterology* 59:1026–1032 DOI [10.5754/hge11300](https://doi.org/10.5754/hge11300).

© Copyright 2018 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."