

SCIENTIFIC REPORTS

Veröffentlichung

FACHRICHTUNGEN:

ZIELBESTIMMUNG

EXPERIMENTELLE
MODELLE VON
ERKRANKUNGEN

ENDOKRINOLOGIE

PARKINSONSCHE
KRANKHEIT

Erhalten:
2. Juli 2013

Angenommen:
1. November 2013

Veröffentlicht:
20. November 2013

Bitte richten Sie Ihren
Schriftverkehr und
Materialanforderungen
an A.M.
(akio@faculty.chiba-u.jp)

* Diese Autoren haben
zu gleichen Teilen zu
dieser Arbeit
beigetragen.

Oral zugeführtes „Wasserstoff-Wasser“ löst die Sekretion (Ausschüttung) neuroprotektiven (Nervenzellen und -gewebe schützenden) Ghrelins in Mäusen aus

Akio Matsumoto^{1,2,5*}, Megumi Yamafuji^{3*}, Tomoko Tachibana¹, Yusaku Nakabeppu^{4,5}, Mami Noda^{3,5} & Haruaki Nakaya¹

¹Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, ²Division of Molecular Design, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, ³Laboratory of Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, ⁴Division of Neurofunctional Genomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, ⁵Research Center for Nucleotide Pool, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Das therapeutische Potenzial molekularen Wasserstoffs (H₂) ist bei einer ganzen Reihe von menschlichen Erkrankungen und ihren entsprechenden Tiermodellen zu Tage getreten, insbesondere bei der parkinsonschen Krankheit (PK). Es zeigte sich, dass die Supplementierung (Zugabe, Ergänzung) von H₂ zum Trinkwasser krankheitsmodifizierende Effekte bei PK-Patienten hatte, sowie neuroprotektive Effekte in experimentellen Tiermodellen mit Mäusen, bei denen PK künstlich induziert (ausgelöst, herbeigeführt) worden war. Die Supplementierung von H₂ resultiert jedoch nicht in nachweisbaren Veränderungen der striatalen (zum Streifenkörper des Gehirns (Striatum) gehörigen) H₂-Konzentrationen, was auf einen indirekten Effekt hinweist. Wir weisen hier nach, dass die Supplementierung von H₂ zu einer Erhöhung der gastrischen (den Magen betreffenden) Expression mRNA-codierenden Ghrelins (Ghrelin: Growth Hormone Release Inducing, dt.: Wachstumshormonfreisetzung einleitendes Peptidhormon) und zu einer Erhöhung der Sekretion von Ghrelin führt, welche durch den β₁-Adrenozeptorenblocker (Betablocker) Atenolol antagonisiert (antagonisieren: entgegenwirken, bekämpfen) wird. Auffallend dabei war, dass der neuroprotektive Effekt des H₂-Wassers entweder durch Hinzufügung des Ghrelinrezeptor-Antagonisten D-Lys³ GHRP-6 (Wachstumshormonfreisetzung einleitendes Peptid 6) oder durch Atenolol aufgehoben wurde. Der neuroprotektive Effekt von H₂ bei PK wird also durch die erhöhte Produktion von Ghrelin vermittelt. Unsere Studienergebnisse weisen auf potenzielle neuartige Strategien zur Verbesserung der Pathophysiologie (Lehre von den krankhaft veränderten Körperfunktionen sowie ihrer Entstehung und Entwicklung) hin, bei der ein Schutzeffekt durch Zugabe von H₂ nachgewiesen werden konnte.

Es liegen Berichte über therapeutische Anwendungen von molekularem Wasserstoff (H₂) bei verschiedenen menschlichen Erkrankungen und ihren entsprechenden Tiermodellen¹ vor, einschließlich Schädigungen durch Ischämie bzw. Reperfusion (verminderte Blutversorgung bzw. Wiederdurchblutung)²⁻⁴, metabolischem Syndrom⁵, Diabetes Mellitus Typ 2⁶, Organtransplantationen⁷⁻⁹, Reduzierung negativer Auswirkungen von medikamentösen Anti-Tumor-Behandlungen^{10,11} sowie Strahlentherapie^{12,13}. Obgleich der Wirkmechanismus von H₂ nicht eindeutig nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass seine antioxidativen Eigenschaften, vor allem in Bezug auf das Hydroxyl-Ridikal (·OH) und Peroxynitrit (ONOO·), die Grundlage für die therapeutische Wirksamkeit bilden². Im Gegensatz zu anderen Therapien mit medizinischem Gas kann H₂ angewendet werden in einem Gemisch mit Luft zur Inhalation oder in Wasser gelöst zum Trinken sowie als intravenöse Injektion oder Dialyse. Während die intravenöse Injektion oder die Dialyse das H₂ direkt dem Blutkreislauf zuführt, muss oral zugeführtes, mit Wasserstoff angereichertes Wasser (Wasserstoff-Wasser, H₂-Wasser) vom Verdauungstrakt aufgenommen werden, was zu begrenzten H₂-Konzentrationen im Blut und den Zielorganen führt^{7,14}.

Die parkinsonsche Krankheit (PK) stand bei den Forschungen zum Thema oxidativer Stress und Krankheit im Mittelpunkt, weil man davon ausgeht, dass die Degeneration dopaminerger (auf Dopamin reagierender) Neuronen durch Anhäufung von oxidativem Stress ausgelöst und verschärft werden kann. Es existieren zwar Untersuchungen zu Therapien mit Antioxidantien bei PK-Patienten, doch eine klinische Wirksamkeit ließ sich nicht nachweisen^{15,16}. Im Gegensatz dazu zeigte eine Pilotstudie zur Therapie mit Wasserstoff-Wasser bei PK-Patienten viel versprechende Resultate¹⁷, und es liegen Berichte vor, dass Wasserstoff-Wasser neuroprotektive Effekte¹⁴ bei Mäusen gezeigt hatte, bei denen PK durch MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin, ein Neurotoxin (Nervengift)) künstlich induziert wurde¹⁸. H₂-Konzentrationen lagen bei den PK-Maus-Modellen unterhalb messbarer Schwellenwerte in der Substantia nigra (dunkel gefärbter Bereich im Mittelhirn)¹⁴, und es ließ sich nachweisen, dass die orale Zuführung von Wasserstoff als Wasserstoff-Wasser die Entwicklung von PK im Ratten-Modell verhinderte, was auf die kontinuierliche Inhalation von 2% H₂ jedoch nicht zutraf¹⁹. Diese Ergebnisse legen nahe, dass für die therapeutischen Effekte von Wasserstoff-Wasser nicht seine antioxidativen Aktivitäten im Hirn erforderlich sind, und außerdem, dass seine Wirksamkeit eine Verarbeitung erfordert, die auf oraler Zuführung beruht.

Der Zweck der gegenwärtigen Studie war der Einsatz des PK-Maus-Modells, um die zu Grunde liegenden Mechanismen der neuroprotektiven Effekte von oral zugeführtem H₂-Wasser darzulegen und zu verdeutlichen. Dabei gingen wir insbesondere von der Hypothese aus, dass oral zugeführter Wasserstoff ein Botenmolekül induziert, das bis ins Hirn vordringt und dort neuroprotektive Aktivitäten ausübt.

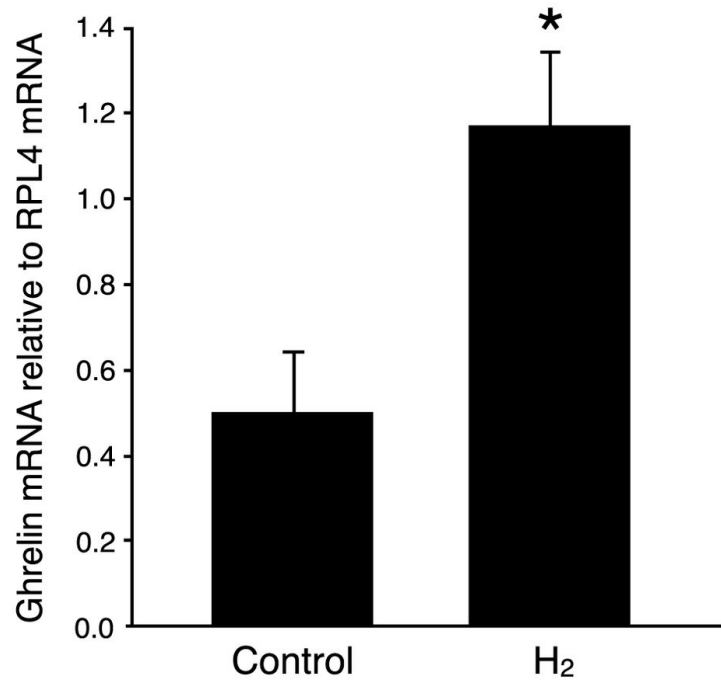


Abb. 1 | Oral zugeführtes H₂-Wasser erhöht die Ghrelin-Genexpression im Magen von Mäusen. Kontroll-Wasser bzw. H₂-Wasser (0,8 ml/Maus), das mit einem Magnesiumstab hergestellt wurde (ca. 0,04 mM H₂; siehe „Methoden“), wurde Mäusen (41 bis 48 Wochen alt; n = 4 pro Gruppe) einmal am Tag für vier aufeinanderfolgende Tage verabreicht. Drei Stunden nach der letztmaligen Wasseraufnahme wurde der Magen entfernt und für eine quantitative Echtzeit-PCR (Verfahren zur quantitativen Bestimmung viraler RNA) präpariert. Die Daten wurden hinsichtlich der Expression von RPL4-mRNA (RPL4: ribosomales Protein L4) normalisiert und werden wiedergegeben als ± SEM (standard error of the mean, dt. Standardfehler des Mittelwertes; dieser gibt an, welchen Fehler der gesuchte Parameter (Stichprobenmittelwert) im Vergleich zum tatsächlichen Parameterwert (Mittelwert der Grundgesamtheit) hat bzw. wie weit der Schätzwert um den tatsächlichen Wert streut.

Ergebnisse

Oral zugeführtes Wasserstoff-Wasser induziert Ghrelin-Genexpression im Magen. Der Magen fungiert als ein endokrines (Hormone direkt ins Blut abgebendes) Organ, das verschiedene Peptidhormone mit einem breiten Spektrum physiologischer Effekte ausschüttet. Wir konzentrierten uns zunächst auf den Magen, um die möglichen Effekte von oral zugeführtem H₂-Wasser auf der Ebene der Geninduktion zu untersuchen. In einer zuvor durchgeführten Studie¹⁴ wurde darauf hingewiesen, dass das Trinken von H₂-Wasser für einen Zeitraum von sieben Tagen vor einer MPTP-Injektion eine Schutzwirkung gegen die Toxizität von MPTP ausübt. Wir verabreichten vier aufeinanderfolgende Tage lang oral H₂-Wasser und analysierten die Expression im Magengewebe von Gastrin (ein Peptidhormon des Magens, das die Produktion von Magensaft stimuliert), Somatostatin (ein Peptidhormon, das von der Bauchspeicheldrüse während der Verdauung ausgeschüttet wird) und Ghrelin durch das Echtzeit-PCR-Verfahren (s.o.). Im Maus-Modell erhöhte sich durch orale Zuführung von H₂-Wasser die Konzentration von Ghrelin-mRNA um das 1,9-fache gegenüber der Kontrollgruppe, die kein Wasserstoff-Wasser erhielt (Abb. 1), wohingegen sich keine Effekte von Wasserstoff-Wasser auf die Expression des Somatostatin-Gens (Expression nur im Spurenbereich) bzw. des Gastrin-Gens (Expression von Individuum zu Individuum sehr unterschiedlich) nachweisen ließen (hier nicht gezeigt).

Um den zeitlichen Verlauf der Ghrelin-Induktion durch Wasserstoff-Wasser zu untersuchen, wurde den Mäusen Wasserstoff-Wasser bzw. Kontroll-Wasser einmal am Tag für 0 (Kontrollgruppe), 1, 2 bzw. 4 Tage verabreicht, woraufhin die Ghrelin-Konzentration im Blutplasma mittels eines ELISA-Test-Kits (ein immunologisches Nachweisverfahren) vier bis fünf Stunden nach der letzten Verabreichung von H₂-

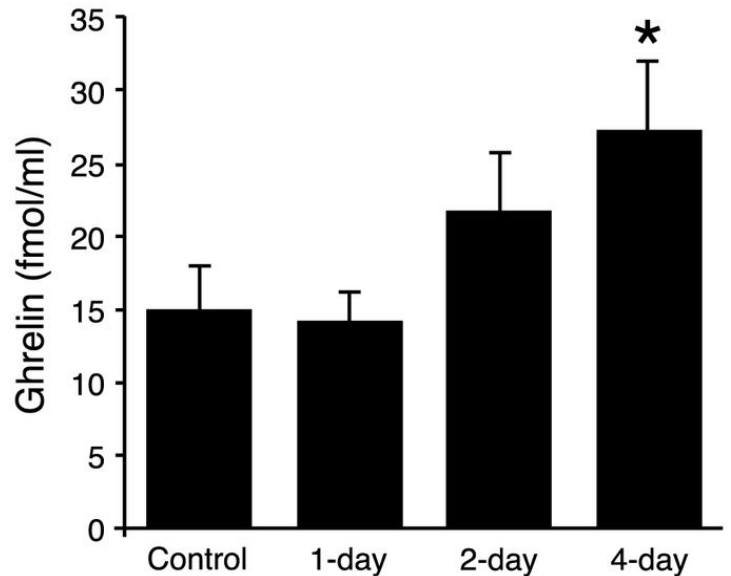


Abb. 2 | Darstellung der Ghrelin-Konzentration im Blutplasma nach oraler Zuführung von H₂-Wasser. Mäuse (16 bis 21 Wochen alt, im Durchschnitt 18,5 Wochen, n = 5-10) erhielten für 1, 2 bzw. 4 Tage H₂-Wasser bzw. Kontroll-Wasser, wie in Abb. 1 dargestellt. Am letzten Tag des Experiments, vier Stunden nach der letztmaligen Wasseraufnahme, erfolgte eine Blutentnahme, und die Ghrelin-Konzentration im Blutplasma wurde mit dem immunologischen Nachweisverfahren ELISA quantifiziert. Die Darstellung zeigt Daten von männlichen Mäusen. Die Ghrelin-Konzentration war nur in der Gruppe von Mäusen, die vier Tage lang H₂-Wasser verabreicht bekam, signifikant höher. Die Daten werden wiedergegeben als ± SEM.

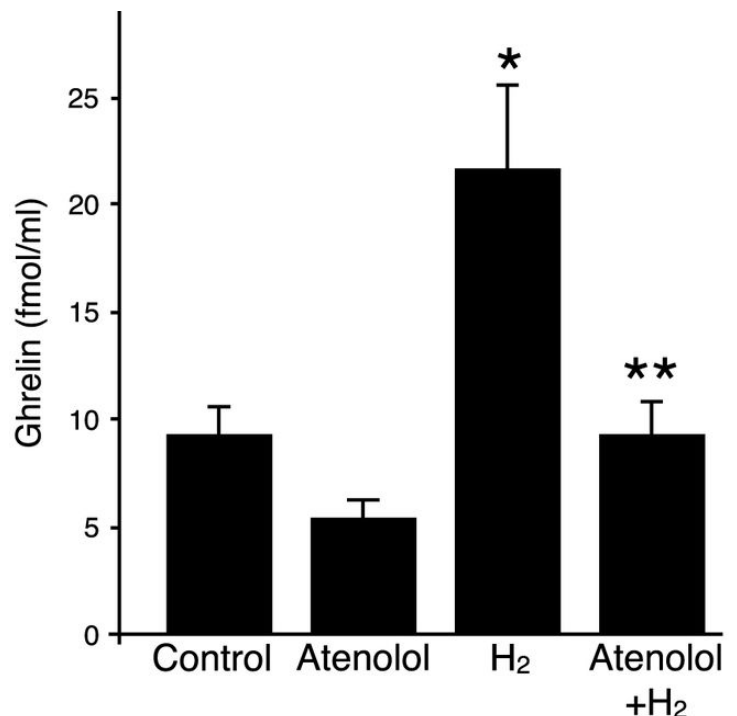


Abb. 3 | H₂-Wasser erhöht die Ghrelin-Konzentration im Blutplasma in einer vom β₁-Adrenorezeptor abhängigen Weise. Am letzten Tag des Experiments wurde die Ghrelin-Konzentration im Blutplasma gemessen. Jeder Gruppe von Mäusen (11 bis 13 Wochen alt; n = 4-5 für jede Gruppe) wurde einmal am Tag für vier Tage Kontroll-Wasser bzw. H₂-Wasser (hergestellt mit einem Freiluft-Wasserelektrolysesystem) verabreicht, und zwar mit bzw. ohne i.p.-Injektion (i.p.: intraperitoneal, innerhalb des Bauchfellraums gelegen bzw. erfolgreich) von Atenolol (10 mg/kg) vor der Wasseraufnahme. Die Gruppe von Mäusen, denen H₂-Wasser verabreicht worden war, wies im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Ghrelin-Konzentration im Blutplasma auf (*p = 0,038), die durch Vorbehandlung mit Atenolol aufgehoben wurde (**p = 0,039). Daten wiedergegeben als ± SEM.

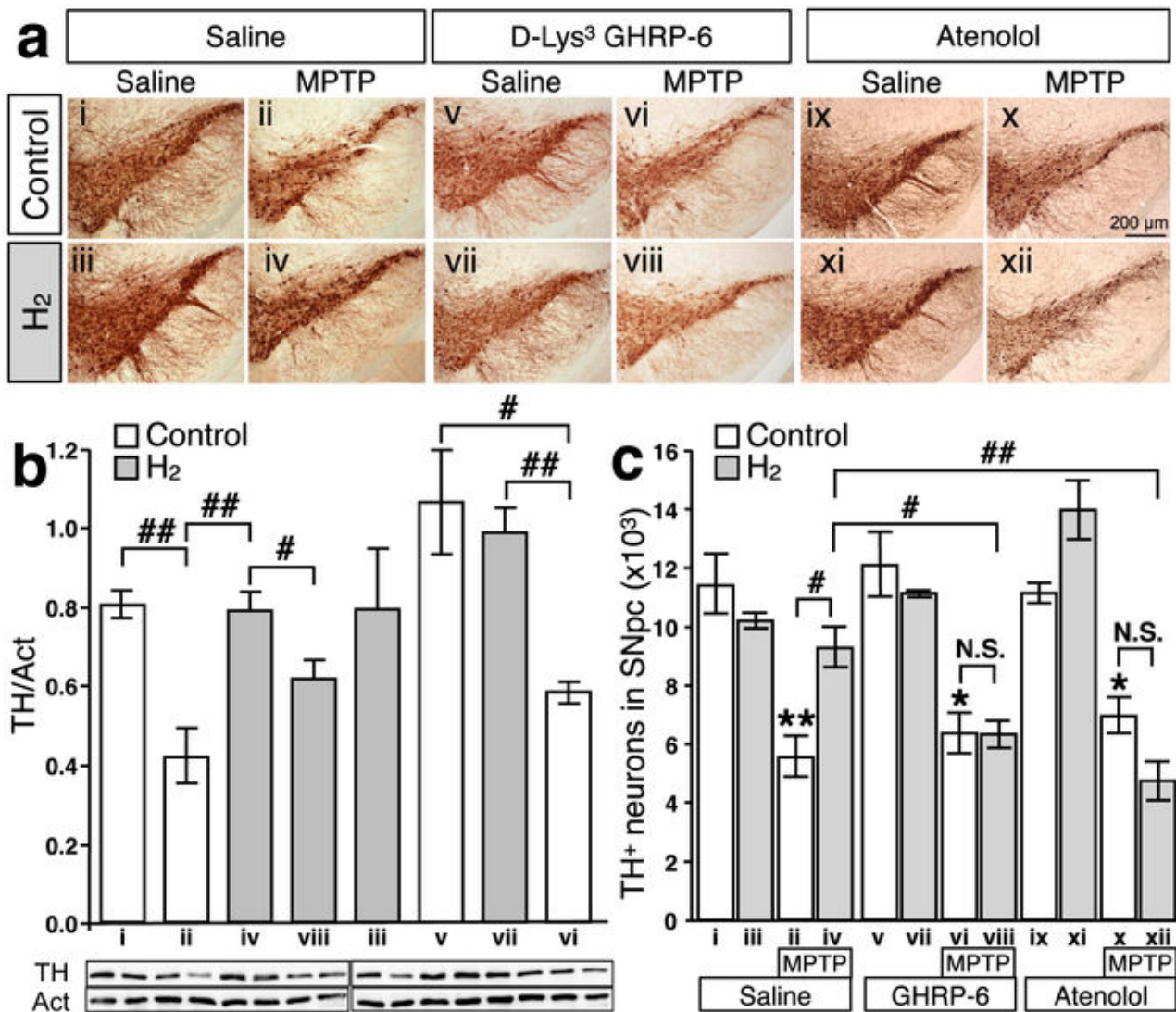


Abb. 4 | Die Inhibition (Hemmung) der Ghrelin-Sekretion bzw. der Ghrelinrezeptor-Antagonist hebt den neuroprotektiven Effekt oral zugeführten H₂-Wassers bei MPTP-induzierter parkinsonscher Krankheit im Maus-Modell (männlich, 8 bis 12 Wochen, n = 2-5 für jede Gruppe) auf. Wie unter „Materialien“ und „Methoden“ beschrieben, wurde Mäusen auf täglicher Basis mit H₂ gesättigtes Wasser oral zugeführt. (a): In der Pars compacta der Substantia nigra wurde eine Tyrosinhydroxylase (TH)-Anfärbung vorgenommen, wobei den Mäusen alternativ eine Kochsalzlösung-Injektion („Saline“, i–iv) bzw. eine D-Lys³ GHRP-6-Injektion (v–viii) bzw. eine Atenolol-Injektion (ix–xii) verabreicht wurde. Dabei wurde entweder normales Leitungswasser (Kontrolle) oder H₂-Wasser sieben Tage lang verabreicht. Nach sieben Tagen dieser Injektion von D-Lys³ GHRP-6, Atenolol bzw. Kochsalzlösung wurde MPTP injiziert (i.p.) (ii, iv, vi, viii, x und xii). (b): Zusammenfassung der Immunblotting-Analyse (Immunblotting: ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen durch Übertragung (Blotting) auf eine Trägermembran) von TH-Protein im Substantia-Nigra-Gewebe (n = 3-6 für jede Gruppe), wobei die repräsentativen Blot-Abbildungen unten dargestellt werden (zwei Proben pro Gruppe). Die TH-Bandenintensität (Bande, auch Absorptionsbande: in der Spektroskopie eine Gruppe von Linien eines optischen Spektrums) wurde normalisiert zum Aktin-Band bei derselben Probe (### p = 0,007, i vs. ii; 0,010, ii vs. iv; 0,004, vi vs. vii; # p = 0,043, iv vs. viii; 0,023, v vs. vi). Die Daten in den Darstellungen werden wiedergegeben als ± SEM. (c): Zusammenfassung der stereologischen Analyse dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra. Obgleich MPTP-Injektionen einen signifikanten Verlust von TH-positiven Neuronen verursachten (ii) (** p = 0,0001, i vs. ii), führte das Trinken von H₂-Wasser für einen Zeitraum von sieben Tagen vor der MPTP-Behandlung zu einer signifikanten Abschwächung des Verlusts von TH-positiven Zellen (iv) (# p = 0,008, ii vs. iv). Der Ghrelinrezeptor-Antagonist D-Lys³ GHRP-6 bzw. der β₁-Adrenorezeptorenblocker Atenolol hoben den Schutzeffekt von oral zugeführtem H₂-Wasser auf (viii und xii) (# p = 0,008; ii vs. iv; p = 0,003, iv vs. viii; p = 0,0003, iv vs. xii). Die Daten in den Darstellungen werden wiedergegeben als ± SEM. Die statistische Signifikanz der Daten wurde durch eine einfache ANOVA-Varianzanalyse, gefolgt von der Benferroni-Methode (ein Verfahren der mathematischen Statistik zur Neutralisierung bestimmter Messfehler), bestimmt.

bzw. Kontroll-Wasser gemessen wurde. Nur die Mäuse, denen H₂-Wasser vier aufeinanderfolgende Tage verabreicht wurde, zeigten eine signifikante Erhöhung der Ghrelin-Konzentration im Blutplasma, wohingegen die Mäuse, denen Wasserstoff-Wasser nur für zwei Tage verabreicht wurde, keine signifikante Erhöhung dieser Konzentration zeigten (Abb. 2).

β₁-Adrenorezeptor-Signalisierung führt eine Erhöhung der Ghrelin-Sekretion bei oraler Zuführung von Wasserstoff-Wasser herbei. Es wurde nachgewiesen, dass die Magensekretion von Ghrelin durch lokale Auslösereize reguliert wird, u.a. durch Blutzucker, Östrogen, Insulin und Katecholamine (bestimmte Hormone wie Adre-

naline, Noradrenalin und Dopamin, die als Botenstoffe fungieren)²⁰⁻²². Insbesondere wurde nachgewiesen, dass β₁-Adrenorezeptor-Stimulation die Ghrelin-Sekretion in vitro und in vivo erhöht^{22,23}. Wir überprüften die Expression von β₁- und β₂-Adrenorezeptoren in Magengewebe mit der Echtzeit-PCR-Methode und konnten feststellen, dass es nach der oralen Zuführung von H₂-Wasser für vier Tage keine signifikanten Veränderungen der Konzentration gab (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der Ghrelin-Konzentration im Blutplasma durch oral zugeführtes Wasserstoff-Wasser wurde durch Verabreichung des β₁-Adrenorezeptor-spezifischen Blockers Atenolol (10 mg/kg i.p. (siehe Abb. 3), injiziert 30 Minuten vor Verabreichung des H₂-Wassers, an jedem der vier Tage (Abb. 3) eliminiert. Daraus folgt,

dass die Aktivierung der β_1 -Adrenorezeptoren für die durch Wasserstoff-Wasser herbeigeführte Erhöhung des zirkulierenden Ghrelins erforderlich ist.

Blockaden der Ghrelin-Ausschüttung heben bei PK-Modell-Mäusen die Schutzwirkung von H₂-Wasser auf. In einem zuvor veröffentlichten Bericht wurde nachgewiesen, dass oral zugeführtes H₂-Wasser einen signifikant erhöhten Schutz vor Verlust dopaminerger Neuronen aus der Substantia nigra bei Mäusen mit durch MPTP-Injektion künstlich induzierter PK zeigte¹⁴. Um dabei die Rolle, die Ghrelin spielt, direkt zu überprüfen, wurde für einen Zeitraum von sieben Tagen vor der Injektion von MPTP entweder der Ghrelinrezeptor-Antagonist D-Lys3 GHRP-6 (100 nmol/Tag i.p.) oder der β_1 -Adrenorezeptor-Blocker Atenolol (10 mg/kg i.p.) zusammen mit Kontroll- bzw. Wasserstoff-Wasser verabreicht. Sieben Tage nach Verabreichung von MPTP wurde der Verlust von dopaminergen Neuronen aus der Substantia nigra untersucht. Wie in Abb. 4 wiedergegeben, verursachte die systematische Verabreichung von MPTP einen signifikanten Verlust dopaminerger Neuronen aus der Pars compacta der Substantia nigra (SNpc), aufgezeigt durch immunhistochemischen (Immunhistochemie, auch Immunhistologie oder Immun- bzw. Antikörperfärbung genannt) Nachweis von Tyrosinhydroxylase (TH, ein Schlüsselenzym in der Katecholamin-Synthese) (a), und zusätzlich bestätigt durch immunologischen Nachweis von TH-Protein in der Substantia nigra mit Aktin (ein Strukturprotein) als Kontrolle (b), sowie mittels stereologischer Analyse (Stereologie: räumliche Darstellung des Wachstums und Alterns von Körpergeweben) (c). Während die Verabreichung von H₂-Wasser für sich allein in der Kontrollgruppe keine Wirkung zeigte, zeigte sich bei den mit MPTP behandelten Mäusen eine signifikante Verringerung des Verlusts dopaminerger Neuronen durch Verabreichung von Wasserstoff-Wasser, wie bereits zuvor berichtet¹⁴. Auffallend dabei war: Obwohl die Verabreichung von D-Lys3 GHRP-6 oder Atenolol bei der Kontrollgruppe keine Wirkung allein zeigte, und D-Lys3 GHRP-6 oder Atenolol keinen Einfluss auf den durch MPTP induzierten Verlust dopaminerger Neuronen hatte, wurde die Schutzwirkung von Wasserstoff-Wasser entweder durch D-Lys3 GHRP-6 oder Atenolol eliminiert. Daraus folgt, dass die Einleitung der Ausschüttung von gastrischem Ghrelin und die nachfolgende Aktivierung der vom Ghrelin ausgelösten Signalübertragung der Schutzwirkung von Wasserstoff-Wasser im MPTP-Modell der PK unterliegt.

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen auf, dass die neuroprotektiven Effekte von oral zugeführtem Wasserstoff-Wasser, das unwesentliche Konzentrationen von H₂ im Hirn produziert, das Resultat einer Anregung der Produktion des neuroprotektiven Peptidormons Ghrelin im Magen und die nachfolgende Aktivierung des Ghrelinrezeptors sind. Darüber hinaus konnten wir eine obligate (unvermeidliche bzw. unverzichtbare) Rolle von β_1 -Adrenorezeptoren bei der Hochregulierung der durch Wasserstoff-Wasser herbeigeführten Ghrelin-Konzentration im Blutplasma aufzeigen, was im Einklang mit früheren Berichten steht, wonach die adrenerge Stimulation die Freisetzung von Ghrelin *in vitro* und *in vivo* reguliert^{22,24,25}.

Die neuroprotektiven Effekte von Ghrelin bei PK sind gemeinhin bekannt²⁶, und es wurde aufgezeigt, dass der Rezeptor für Ghrelin (GHSR, Growth Hormone Secretagogue Receptor) eine starke Expression durch dopaminerge Neuronen in der Substantia nigra erfährt²⁷. Es wurde darauf hingewiesen, dass Ghrelin eine Schutzwirkung auf nigrostriatale (auf eine neuronale Verbindung zwischen der Substantia nigra und dem Striatum (ein Teil der Basalganglien, die zum Großhirn gehören) hinweisende) Dopamin-Neuronen ausübt, und zwar über einen mitochondrialen, vom Entkopplungsprotein 2 (UCP2) abhängigen Mechanismus^{28,29}. Wir stellten dabei jedoch fest, dass weder die Expression von UCP2 mRNA noch von Protein durch die Verabreichung von H₂-Wasser für einen Zeitraum von sieben Tagen in signifikanter Weise hochreguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Diese

Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein alternativer Signalmechanismus, der der GHSR-Aktivierung nachgeschaltet ist, vorliegen muss, vielleicht unter Einbeziehung des PI3K/Akt-Signalwegs³⁰ (ein Signalweg, der bei vielen Zellvorgängen, die Zellwachstum und -stoffwechsel regulieren, eine wichtige Rolle spielt).

Es liegen Berichte vor, wonach die Verabreichung von mit Wasserstoff gesättigtem Wasser (ca. 0,8 mM) zu Symptomverbesserungen bei PK-Patienten führte¹⁷. Die Verabreichung von Wasserstoff-Wasser mit einem Sättigungsgrad von etwa 0,05% resultierte im Maus-Modell, bei dem PK durch MPTP-Injektion künstlich induziert wurde, in einer erfolgreichen Bewahrung bzw. Erhaltung dopaminerger Neuronen¹⁴. Zur Herstellung von Wasserstoff-Wasser griffen wir auf drei verschiedene Methoden zurück (siehe „Methoden“), die in einer H₂-Konzentration von 0,04 bis 0,8 mM resultierten, und wir konnten beobachten, dass die Auswirkungen des Wasserstoff-Wassers auf die Ghrelin-Produktion und somit den Schutz der Dopamin-Neuronen bei diesen Konzentrationen unabhängig von der Höhe der Dosis waren. Daraus folgt, dass kleine Mengen oral zugeführten Wasserstoffs für die Produktion von Ghrelin im Magen und den nachfolgenden neuroprotektiven Schutz ausreichend sind, auch bei Abwesenheit nachweisbarer H₂-Konzentrationen im Hirn. Ein interessanter Aspekt dabei ist, dass Darm-Mikroorganismen molekularen Wasserstoff in wesentlicher Menge produzieren können, und dass Lactulose, ein synthetisches Disaccharid (Zweifachzucker), ein effektives Substrat (hier: Nährboden) zur Erhöhung der bakteriellen Wasserstoff-Produktion im Dickdarm darstellt³¹. Die Einnahme von Lactulose selbst zeigte jedoch keine signifikanten Effekte auf die Überlebensrate dopaminerger Neuronen im Ratten-Modell, bei dem PK durch 6-OHDA (6-Hydroxydopamin, ein Neurotoxin) ausgelöst wurde (obgleich sich die alveolare (die Lungenbläschen betreffende) H₂-Konzentration erhöhte)¹⁹. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Ghrelin-Produktion im Magen bei der neuroprotektiven Aktivität von H₂. Oral zugeführtes H₂-Wasser wird als Therapeutikum bei PK erforscht, ebenso wie bei einer Reihe anderer menschlicher pathophysiologischer Bedingungen^{17,32,33} unter der allgemeinen Annahme, dass der Wirkmechanismus von ergänzend zugeführtem H₂ vermutlich eine antioxidative Rolle spielt. Unsere Ergebnisse, die darauf hinauslaufen, dass oral zugeführtes H₂-Wasser einen neuroprotektiven Effekt durch Aktivierung eines endogenen (körpereigenen) gastrischen (den Magen betreffenden) Ghrelinsystems ausübt, der eng mit dem β -Adrenorezeptor-Signalmechanismus verbunden ist, weist auf die Möglichkeit neuartiger Anwendungen der H₂-Therapie bei verschiedenen Krankheiten hin.

Methoden

Tiere. Die Tierversuche wurden von der Prüfungskommission für Tierpflege an der Chiba University und der Kyushu University genehmigt und in Übereinstimmung mit den vom Science Council of Japan (japanischer Rat für Wissenschaft) erstellten Richtlinien durchgeführt. Alle Versuchstiere (C57BL/6J) wurden in der Tierhaltungsanlage unter kontrollierten Temperatur- und Lichtbedingungen (12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkelheit) gehalten, erhielten Standard-Mäusefutter sowie gefiltertes sterilisiertes Wasser *ad libitum* (nach Belieben).

Präparation und Verabreichung von H₂-Wasser. H₂-Wasser wurde durch Einsatz von drei Methoden hergestellt. Bei der ersten Methode kam die spontane Ionisations-Reaktion von Magnesium mit Wasser zum Einsatz¹⁴. Ein Magnesiumstab (AZ31, Nakagawa Metal, Japan, bestehend aus 96% Magnesium, 3% Aluminium und 1% Zink) wurde poliert, um Oxid-Ablagerungen von der Oberfläche zu entfernen und mit 1 N Chlorwasserstoff gereinigt, bevor er für 15 bis 20 Minuten bei 25°C ins Trinkwasser eingebracht wurde. Die zweite Herstellungsmethode beruhte auf der Elektrolyse von Wasser mit Platin-Elektroden bei 150 V DC für 20 Minuten (Freiluft-Wasserelektrolyse-Verfahren). Dabei wurde die Anode innerhalb eines Trinkhalms platziert, um den entstandenen Sauerstoff sofort abzugasen. Bei der dritten Methode (die bei den Experimenten mit Mäusen zum Einsatz

Tabelle 1: Primer-Sets beim Einsatz der Echtzeit-PCR-Analysen

RPL4.For	GCCAAGACTATGCGCAGGAAT
RPL4.Rev	GTAGCTGCTGCTTCCAGCTT
Ghrelin.For	TCAAGCTGTCAGGAGCTCAGTA
Ghrelin.Rev	TTGTCAGCTGGCGCCTCTT
Somatostatin.For	TGGTGCCTCTGCATCGT
Somatostatin.Rev	AGTACTTGGCCAGTTCCTGTT
Gastrin.For	CAGCGCCAGTTCAACAAGCT
Gastrin.Rev	ATTCGTGGCCTCTGCTTCTT
b1AR.For	CACTGTGGACAGCGATTCTGA
b1AR.Rev	ACCTTGGACTCCGAGGAGAA
b2AR.For	ACAGGAACTGCTGTGTGAGGAT
b2AR.Rev	ACGTAAGGCTAGGCACAGT

kam, bei denen PK durch MPTP-Injektion künstlich induziert wurde) wurde Wasserstoff-Gas durch ein Elektrolyseverfahren erzeugt, bei der eine Polymer-Elektrolyt-Membran verwendet wurde. Bei einer Spannung von 5 V DC wurden Katode und Anode durch diese Polymer-Elektrolyt-Membran (Nafion® E.I., du Pont de Nemours & Co., Inc.) getrennt und das Wasserstoff-Gas mittels eines Polyethylen-Schlauchs aufgefangen. Zur Herstellung gesättigtem H₂-Wassers wurde das Wasserstoff-Gas dann in eine mit Wasser gefüllte Trinkwasserflasche eingesprudelt. Das mit dieser Methode hergestellte H₂-Wasser wurde dann in versiegelte Behälter abgefüllt, mit denen die Sättigung des Wassers mit Wasserstoff-Gas für einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden gewährleistet war.

Bei den meisten Experimenten erhielt jede Maus einmalig jeden Morgen 0,8 ml H₂-Wasser (innerhalb von 30 Minuten nach Herstellung verabreicht) oder Kontroll-Wasser (hergestellt durch Abkochen von H₂-Wasser zur Entgasung) mit einer Fütterungsnadel gemäß des Experimentplans. Bei den Experimenten mit MPTP-induzierter PK erhielten die Versuchstiere alle 24 Stunden frisches H₂-Wasser, wobei die Wasseraufnahme für einen Zeitraum von sieben Tagen vor der MPTP-Verabreichung ad libitum erfolgte.

Messungen der Ghrelin-Expression. Für eine erste Überprüfung der veränderten Expression gastrischer Enzyme wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter zwischen 41 und 48 Wochen (n = 4 für jede Gruppe) ausgewählt, da die Menge ihrer Nahrungsaufnahme relativ stabil ist, was seinerseits wohl den größten Einfluss auf die Expression der Verdauungsenzyme ausübt. Da die vorangegangene Studie mit männlichen Versuchstieren durchgeführt wurde¹⁴, wurden für die folgenden Experimente ebenfalls männliche Tiere ausgewählt. Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Ghrelin-Induktion durch Wasserstoff-Wasser wurden männliche Mäuse (16 bis 21 Wochen alt, Durchschnittsalter 17,9 Wochen, n = 5-10 in jeder Gruppe) ausgewählt. Veränderungen in der durch den Adrenorezeptor herbeigeführten Ghrelin-Konzentration wurde bei männlichen Versuchstieren (Alter zwischen 11 und 13 Wochen, n = 4-5 für jede Gruppe) analysiert. Zu beachten ist hierbei, dass es für die Zeitdauer des Experiments (4 Tage) nicht zu einer Veränderung des Körpergewichts um mehr als 1 g kam. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der vorangegangenen Studie, bei der an den Mäusen eine Injektion von rekombinantem (durch Rekombination künstlich hergestelltem) Ghrelin vorgenommen wurde, bei der die Veränderung des Körpergewichts innerhalb eines Zeitraums von drei Tagen ebenfalls unter 1 g lag³⁴.

Für einen Zeitraum von vier Tagen wurde den Mäusen H₂-Wasser bzw. Kontroll-Wasser gemäß des Experimentplans verabreicht. Am Ende des Experiments wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation (Genickbruch) letalisiert (getötet), wonach den Mäusen mittels Kardipunktur (Herz-Einstich) mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) als Anti-Gewinnungsmittel Blut entnommen wurde.

Das Blut wurde dann für 5 Minuten bei 4°C und 2000 g (2000-fache Erdbeschleunigung / Schwerkraft) zentrifugiert, das Blutplasma gewonnen und mit 1 N Chlorwasserstoff (10% des Blutplasmavolumens) gemischt, um eine inaktivierende Deacylierung (Abspaltung von Acyl-Gruppen) von Ghrelin zu vermeiden²⁰. Die Proben wurden bis zur Analyse bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt. Nach der Blutentnahme wurde der Magen in intaktem Zustand und zur weite-

ren Analyse mit Flüssig-Stickstoff schockgefroren. Zum Zwecke der Konsistenz (Übereinstimmung, Stetigkeit) wurden die Mäuse 4 bis 5 Stunden nach der letzten Aufnahme von H₂-Wasser und jeweils zur selben Tageszeit letalisiert. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme befand sich im Magen noch fast die gesamte Menge an Futter, was nahelegt, dass die Verabreichung von Wasser (jeweils 0,8 ml/Verabreichung) mittels Fütterungsnadel keine dauerhafte Verringerung des Appetits herbeigeführt hatte.

Die aktive Form des Ghrelins wurde im Blutplasma mittels des immunologischen ELISA-Nachweisverfahrens (Active Ghrelin ELISA Kit, Sceti, Japan) nach Angaben des Herstellers gemessen. Für den Einsatz des semiquantitativen PCR-Verfahrens wurde Magengewebe in Flüssig-Stickstoff tiefgefroren und dann in ein feines Granulat zerkleinert, woraufhin die Gesamt-RNA mit RNAiso (Takara, Japan) nach Angaben des Herstellers extrahiert wurde.

2 µg Gesamt-RNA wurden dann verwendet, um eine Erst-Strang cDNA-Synthese mit einem SuperScript VILO cDNA Synthese-Kit (Invitrogen, USA) vorzunehmen.

Die mRNA-Expressionsraten wurden mittels des Echtzeit-PCR-Verfahrens mit SYBR Green (Thunderbird Sybr qPCR Mix, Toyobo, Japan; ein Cyanin-Farbstoff, der in der Molekularbiologie zum Nachweis von doppelsträngiger DNA benutzt wird) quantifiziert. Die spezifischen Primer-Sets beim Einsatz der Echtzeit-PCR-Analysen werden in Tabelle 1 wiedergegeben und auf ribosomale Protein L4 (RPL4) mRNA normalisiert^{35,37}.

Verabreichung des Ghrelinrezeptor-Antagonisten, β_1 -Adrenorezeptorenblockers und MPTP.

Der Ghrelinrezeptor-Antagonist D-Lys3 GHRP-6 (Sigma-Aldrich, USA; 100 nmol/Tag), der β_1 -Adrenorezeptorenblocker Atenolol (ICI, USA; 10 mg/kg) bzw. Kochsalzlösung wurde täglich für einen Zeitraum von sieben Tagen durch Injektion i.p. in Verbindung mit frisch zubereitetem Kontroll- bzw. H₂-Wasser verabreicht. Am siebten Tag wurde in Zwei-Stunden-Intervallen viermal MPTP-HCl (Sigma-Aldrich, USA; 15 mg/kg in 0,9% NaCl pro Injektion) bzw. Kochsalzlösung als Kontrollmedium i.p. injiziert. Über die folgenden sieben Tage erhielten die Mäuse unbehandeltes Leitungswasser, bevor ihnen unter Tiefennarkose (Pentobarbital, 50 mg/kg i.p.) die Hirne entfernt wurden.

Stereologische und immunologische Analysen der nigralen dopaminergen Neuronen.

Eine stereologische Analyse wurde wie beschrieben durchgeführt^{14,38-40}. Unter Verwendung eines MIKROM Kryostaten (Kühlgerät, mit dem sehr tiefe Temperaturen erreicht und konstant gehalten werden können) wurden aus der Pars compacta der Substantia nigra (SNpc) koronale Sektionen (Hirnschnitte) mit etwa 30 µm Dicke angefertigt (-2,70 mm bis -3,80 mm relativ zum Bregma)⁴¹. Frei schwebende Sektionen wurden 30 Minuten lang mit dem Blockingreagenz Block Ace (Dainippon Pharmaceuticals, Japan) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper (TH) (Chemicon, USA, 1 : 3.000 in 10% Block Ace) für zwei Tage bei 4°C. Nach dem Waschen wurden die Sektionen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in eine 3%ige H₂O₂-Lösung mit Methanol/PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) im Verhältnis Methanol/PBS 1:1 eingetaucht, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation in biotinyliertem (Biotinylierung: Vorgang der kovalenten Bindung von Biotin an ein Molekül, meistens ein Protein oder DNA) Antikörper „Goat Anti-Rabbit IgG“ (1 : 400, Vector, USA) und Bearbeitung mit einem Vectastain ABC-Kit (Vector, USA, Nachweissystem für die Immunologie und Molekularbiologie) unter Verwendung von 3'3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Vector, USA) als Peroxidase-Chromogen (Chromogen: Vorstufe eines Farbstoffs, die erst nach Umwandlungsreaktion zum Farbstoff wird).

Unverzerrte stereologische Zählungen von TH-immunreaktiven Zellkörpern in der SNpc wurden mittels optischer Fraktionierung⁴² (stereologische Methode zur Quantifizierung der Bildung neuer Neuronen) und unter Verwendung der Stereo Investigator Software (Stereo Investigator 8, MicroBrightField Inc., USA) vorgenommen. Der Rand der SNpc wurde unter 100-facher Vergrößerung dargestellt,

und in jeder dritten Sektion (acht Sektionen pro Hirn) wurde eine Zählung der immunopositiven Neuronen bei 400-facher Vergrößerung mit einem Nikon ECLIPSE 80 i Mikroskop unter Verwendung eines 70 x 70 µm-Rasters auf einem Zählraster (75 x 100 x 12 µm) mit 2 µm weiten oberen und unteren Randbereichen vorgenommen. Die Fehlerabschätzung nach Gundersen (Methode zur Bestimmung der möglichen Abweichung eines Messwertes vom wahren Wert) lag bei allen Proben bei < 0,07.

Der immunologische Nachweis und die Quantifizierung der TH-Expression im Substantia Nigra-Gewebe wurden mittels Immunblotting-Analyse unter Verwendung von Aktin als Kontrollmedium vorgenommen. Alle Versuchstiere wurden auf dieselbe Weise präpariert wie jene, die zur stereologischen Analyse herangezogen wurden. Die Substantia nigra wurde entfernt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Proben wurden auf Eis in einer hypotonischen Pufferlösung (Lösung mit einem geringeren osmotischen Druck als ein Vergleichsmedium) bestehend aus 20 mM Hepes pH 7,6, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA und 0,1% Triton X-100 lysiert (aufgeschlossen), mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, USA) behandelt und für 10 Minuten bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert. Nach Quantifizierung der Proteinkonzentration unter Verwendung der BCA-Methode (Methode zur Messung des Proteingehalts im Überstand nach einer Zentrifugierung) mit BSA als Kontrollmedium wurden 5 µg des in eine reduzierende Probenpuffer-Lösung eingegebenen Gewebe-Lysats mit 10% SDS-PAGE (Stoffgemisch zur Analyse von Proteinen) gelöst, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, über Nacht bei 4°C mit Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper (1 : 2000) versetzt und dann untersucht. Die Proteine wurden unter Verwendung von „Anti-Rabbit“-Sekundär-Antikörpern, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, ein Marker für den Nachweis von Proteinen oder Nukleinsäuren nach einem Blot) und einem Chemilumineszenz-Nachweissystem (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, USA) visualisiert. Die Chemilumineszenz-Aufnahmen wurden mittels Gauge Application (Fuji Film, Japan) quantifiziert, und der Wert wurde normalisiert zum Aktin-Band bei derselben Probe, spezifiziert durch monoklonale Anti-Aktin-Antikörper (Clone C4, Millipore, USA).

Statistische Analyse und Datenhandhabung. Die statistische Signifikanz der Daten wurde, wo nicht anders angegeben, mittels eines unpaarigen zweiseitigen Student t-Tests bestimmt, und die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant eingestuft.

Quellenangaben (englisch)

- Ohta, S. *Recent Progress Toward Hydrogen Medicine: Potential of Molecular Hydrogen for Preventive and Therapeutic Applications*. *Curr. Pharm. Des.* 17, 2241–2252 (2011).
- Ohsawa, I. et al. *Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals*. *Nat. Med.* 13, 688–94 (2007).
- Hayashida, K. et al. *H₂ gas improves functional outcome after cardiac arrest to an extent comparable to therapeutic hypothermia in a rat model*. *J. Am. Heart Assoc.* 1, e003459 (2012).
- Fukuda, K. et al. *Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 670–4 (2007).
- Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I. & Ohta, S. *Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice*. *Obesity (Silver Spring)*. 19, 1396–403 (2011).
- Kajiyama, S. et al. *Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance*. *Nutr. Res.* 28, 137–43 (2008).
- Cardinal, J. S. et al. *Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats*. *Kidney Int.* 77, 101–109 (2009).
- Kawamura, T. et al. *Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats*. *Transplantation* 90, 1344–51 (2010).
- Buchholz, B. M. et al. *Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury*. *Am. J. Transplant* 8, 2015–24 (2008).
- Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I., Asoh, S. & Ohta, S. *Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 753–61 (2009).
- Matsushita, T., Kusakabe, Y., Kitamura, A., Okada, S. & Murase, K. *Investigation of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging*. *Jpn. J. Radiol.* 29, 503–12 (2011).
- Qian, L. et al. *Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice*. *Free Radic. Res.* 44, 275–82 (2010).
- Schoenfeld, M. P. et al. *Hydrogen therapy may reduce the risks related to radiation-induced oxidative stress in space flight*. *Med. Hypotheses* 76, 117–8 (2011).
- Fujita, K. et al. *Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease*. *PLoS One* 4, e7247 (2009).
- Jenner, P. *Oxidative stress in Parkinson's disease*. *Ann. Neurol.* 53 Suppl 3, S26–36; discussion S36–8 (2003).
- Dexter, D. T. & Jenner, P. *Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms*. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 132–44 (2013).
- Yoritaka, A. et al. *Pilot study of H₂ therapy in Parkinson's disease: A randomized double-blind placebo-controlled trial*. *Mov. Disord.* 28, 836–9 (2013).
- Heikkilä, R. E., Hess, A. & Duvoisin, R. C. *Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice*. *Science* 224, 1451–3 (1984).
- Ito, M. et al. *Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats*. *Med. Gas Res.* 2, 15 (2012).
- Kojima, M. & Kangawa, K. *Ghrelin: structure and function*. *Physiol. Rev.* 85, 495–522 (2005).
- Kamegai, J. et al. *Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach*. *Regul. Pept.* 119, 77–81 (2004).
- Zhao, T. et al. *Ghrelin secretion stimulated by b1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15868–73 (2010).
- Gagnon, J. & Anini, Y. *Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture*. *Endocrinology* 153, 3646–56 (2012).
- Gagnon, J. & Anini, Y. *Glucagon stimulates ghrelin secretion through the activation of MAPK and EPAC and potentiates the effect of norepinephrine*. *Endocrinology* 154, 666–74 (2013).
- Iwakura, H. et al. *Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro*. *Endocrinology* 152, 2619–25 (2011).
- Andrews, Z. B. *The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function*. *Trends Neurosci.* 34, 31–40 (2011).
- Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. *Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain*. *J. Comp. Neurol.* 494, 528–48 (2006).
- Andrews, Z. B. et al. *UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals*. *Nature* 454, 846–51 (2008).
- Andrews, Z. B. et al. *Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism*. *J. Neurosci.* 29, 14057–65 (2009).