Neurosci. Bull.
https://doi.org/10.1007/s12264-020-00597-1

www.neurosci.cn
www.springer.com/12264

GENNEMGA

Molekylær brints neurobeskyttende effekt: En kritisk gennemgang

Wei Chen[1,2] · Han-Ting Zhang[3] · Shu-Cun Qin[1,2]

Modtaget: 19. februar 2020/Accepteret: 31. maj 2020
Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS 2020

Sammendrag Molekylær brint (H_2) er en fysiologisk inaktiv luftart. I de sidste 10 år har en stadig stigende mængde evidens dog påvist brints biologiske funktioner under patologiske forhold. Mere specifikt handler det om, at H_2 har beskyttende egenskaber i forhold til flere sygdomme, især nervesystemlidelser, herunder iskæmi/reperfusionsskade, traumer, subarachnoidalblødning, nervesmerter, neurodegenerative sygdomme, kognitiv dysfunktion induceret af operation og anæstesi, angst og depression. Hertil kommer, at H_2 har flere beskyttende egenskaber primært via antioxidation, antiinflammation, antiapoptose, regulering af autofagi og bevarelse af mitokondrisk funktion og blod-hjerne-barrieren (BBB). Herudover er det nemt at bruge H_2, og den neurobeskyttende effekt opnås uden større bivirkninger. Det indikerer, at administration af H_2 potentielt kan udgøre en behandlingsstrategi. Her opsummerer vi H_2-donorerne og disses farmakokinetik. Sideløbende gennemgår vi effektiviteten og sikkerheden af H_2 som behandling til forskellige sygdomme i nervesystemet baseret på prækliniske og kliniske studier. Det fører til den konklusion, at H_2 muligvis er en enkel og effektiv klinisk behandling til sygdomme i centralnervesystemet (CNS), f.eks. iskæmi/reperfusionsskader i hjernen, Parkinsons og sygdomme karakteriseret af kognitiv dysfunktion. Herudover analyseres de mekanismer, der potentielt indgår i den beskyttende effekt af H_2.

Nøgleord Molekylær brint (H_2) Neurologisk sygdom Neurobeskyttelse Antioxidation Antiinflammation Antiapoptose

Mail Han-Ting Zhang
hzhang@hsc.wvu.edu

Mail Shu-Cun Qin
13583815481@163.com

1 Taishan Institute for Hydrogen Biomedicine, Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an 271000, Kina

2 Key Laboratory of Atherosclerosis in Universities of Shandong, Institute of Atherosclerosis, Shandong First Medical University og Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an 271000, Kina

3 Departments of Neuroscience and Behavioral Medicine og Psychiatry, Rockefeller Neurosciences Institute, West Virginia University Health Sciences Center, Morgantown, WV 26506, USA

Published online: 20 October 2020

Indledning

Molekylær brint (H_2) blev opdaget af kemikeren Henry Cavendish i 1766. Det er en farveløs, lugtfri og fysiologisk inaktiv luftart. De biologiske funktioner af H_2 blev gradvist påvist af forskerne i slutningen af det 20. århundrede. I 1975 opdagede Dole [1], at hyberbar H_2 (2,5 % O_2 og 97,5 % H_2) forårsager regression af pladeepitelkarcinom hos hårløse albinomus. Han opstillede en hypotese om, effekten af H_2 muligvis kan tilskrives gassens evne til at regulere den meste skadelige OH-radikal (oxidanthydroxyl). I 2001 opdagede Gharib [2], at 0,7 MPa H_2 har en antiinflammatorisk effekt på kronisk leverinflammation, der skyldes schistosomiasis. Flere år senere, i 2007, påviste Shigeo Ohta, at H_2 har den samme beskyttende effekt som antioxidanter i hjernevæv, der udsættes for oxidativt stress, ved selektivt at regulere den cytotoksiske frie radikal OH og peroxynitrit ($ONOO^-$) [3]. Siden da har disse resultater udløst et antal studier, hvor man har undersøgt den

potentielle beskyttende effekt af H_2 i forhold til flere sygdomme og de relaterede molekylære mekanismer.

Sygdomme, der skyldes abnormalitet i nervesystemets struktur og funktion, er normalt meget voldsomme sygdomme med høj incidens af invaliditet og mortalitet over hele verden. Genoprettelse af den neurale struktur og funktion efter enten akut skade eller kronisk neurodegeneration er stadig en udfordring, da der ikke findes effektive helbredelsesmuligheder til de fleste neurologiske sygdomme, og sygdommenes reaktion på traditionel intervention såsom medicin, fysioterapi, neurorehabilitation og forebyggende tiltag er ikke god. I modsætning hertil har stadig mere evidens vist, at H_2 har en beskyttende effekt i forhold til forskellige neurologiske sygdomme, herunder iskæmi/reperfusionsskade [4–6], traume [7, 8], subarachnoidalblødning (SAH) [9, 10], nervesmerter [11, 12], Alzheimers [13, 14], Parkinsons [15, 16], stemningsforstyrrelser [17, 18], glioblastom [19] og hjerneinfarkt [20]. Til dato er der udført mere end 60 kliniske forsøg vedrørende brugen af H_2 til mange sygdomme, der involverer flere systemer, og mindst 10 af forsøgene omhandlede nervesystemsygdomme, herunder akut cerebral iskæmi [4], akut hjerneinfarkt [20], følger efter hjertestop [21, 22], Parkinsons [23, 24] og stemningsforstyrrelser [18].

Der en række fordele ved H_2 som en neurobeskyttende gas. For det første kan gassen passere blod-hjerne-barrieren (BBB), penetrere biomembraner og diffundere til cytosol og organeller [3]. Hertil kommer, at der ikke er dokumenteret større bivirkninger [4]. Endnu vigtigere er det, at gentagen administration af H_2 ikke forårsager intolerance [25]. Der findes endvidere flere letanvendelige og praktiske administrationsmuligheder [26, 27]. Endelig har H_2 en beskyttende effekt i forhold til adskillige sygdomme, herunder sygdomme i det perifere nervesystem og centralnervesystemet (CNS) [26, 28]. I Japan er inhalation af 2 % H_2 f.eks. godkendt til klinisk nødbehandling af hjertestop. Det betyder, at H_2 er en ny og potentiel terapeutisk strategi til forebyggelse og behandling af adskillige sygdomme, herunder neurologiske sygdomme. De fordele, som følger af H_2, har yderligere ført til udvikling af H_2- sundhedsindustrien.

I denne gennemgang er det vores mål at opsummere den aktuelle viden om den neurobeskyttende effekt af H_2 i forhold til forskellige nervesystemsygdomme (fig. 1) og de mekanismer, der muligvis indgår (tabel 1).

H_2-donorer

Aktuelt er der adskillige metoder til administration af H_2, herunder inhalation af H_2-gas, indtagelse af H_2-beriget vand, injektion af H_2-beriget saltvand, bade i vand med H_2, indtagelse af en fast H_2-bærer (koral calciumhydrid) og H_2-producerende forløbere (f.eks. laktulose og L-arabinose) [27, 65–67], samt funktionelle mikro-/nanomaterialer til målrettet levering af H_2 [68].

I klinisk praksis omfatter de almindelige administrationsmetoder for H_2 primært inhalation af H_2-gas, indtagelse af brintberiget vand, injektion af brintberiget saltvand og bade i H_2-vand. Inhalation af H_2 er den nemmeste og mest direkte metode, og den oftest anvendte koncentration er 1 % - 4 % (sikker koncentration). I sammenligning med inhalation af H_2-gas er indtagelse af brintberiget vand mere sikkert og mere praktisk. Brintberiget saltvand indgives normalt via IV eller intraperitoneal injektion. Brintbade anvendes ofte til behandling af hudsygdomme [69]. Når H_2 administreres via indtagelse af brintberiget vand, frigives 59 % af det nedsvælgede H_2 i åndedrættet, ca. 0,1 % via kroppens overflade og ca. 40 % optages i kroppen [70]. Efter frivilliges indtagelse af 500 ml brintberiget vand på under 1 min. nåede koncentrationen af H_2 i åndedrættet et peak-niveau på ca. 36 ppm efter 10 min., hvorefter det gradvist faldt til baseline-niveau på ca. 7,0 ppm efter 60 min. [70]. Ono et al. opdagede, at koncentrationen af H_2 i både arterie- og veneblod hurtigt stiger og når et plateauniveau (10 lmol/l til 20 lmol/l) på 20 min. efter opstart af 3 % og 4 % H_2. Ved seponering af inhalation af H_2 falder koncentrationen i arterieblod til <10 % af plateauniveau på ca. 6 min., men på ca. 18 min. i veneblod [4]. Under 30 min. IV infusion af brintberiget saltvand (0,8 mmol/l) stiger koncentrationen af H_2 hurtigt i både arterie- og veneblod til maks. (< 1,8 ppm) efter ca. 15 min., og falder hurtigt ved seponering af infusion af brintberiget saltvand [71]. Generelt fører inhalation til en højere koncentration af H_2 i blodet end IV infusion [71]. Dyreforsøg har endvidere vist, at inhalation inducerer højere koncentrationer af H_2 i hjernen end andre metoder til administration af H_2 (oral, intraperitoneal, intravenøs) [72]. Disse resultater antyder, at inhalation er den foretrukne administrationsform til behandling med H_2 ved CNS-sygdom.

Selvom inhalation, oral indtagelse og injektion af H_2 på effektiv vis dæmper sygdomme i nervesystemet, sådan som det er påvist af forskellige forskningsgrupper [6, 20, 73], mangler der sammenligninger af de biologiske effekter af de forskellige brintinterventionsmetoder i forbindelse med en bestemt sygdom. Da koncentrationen af H_2 i væv og organer er meget forskellig i overensstemmelse med den valgte intervention [72, 74], kan administration ved hjælp af forskellige metoder have forskellig virkning i det samme beskadigede væv. Hertil kommer, at kun få studier har fokuseret på dosis- og tidsafhængige effekter og tolerance overfor H_2 i grundlæggende og kliniske studier. For at vælge den mest effektive behandlingsmetode med H_2 for hver sygdom er det derfor vigtigt at opnå yderligere forståelse for farmakokinetikken og terapeutisk virkning af de forskellige H_2-donortyper. I musemodeller for Alzheimers reducerer intracerebral injektion af nanopartikler med Pd-hydrid (PdH) overgenereringen af amyloid beta (Ab) i hjernen [14], mens indtagelse af brintberiget vand ikke udviser den samme effekt [13]. Opløseligheden af H_2 er lav, og gassens koncentration i musehjerner er væsentligt lavere (< 30 ppb/g) ved traditionel administration (indtagelse af brintberiget vand, injektion af brintberiget saltvand og inhalation of 4 % H_2) [72]. PdH-nanopartiklerne, som er et H_2-opbevaringsmateriale med høj nyttelast, frigiver bæredygtigt ca. 6 lmol/l H_2 indenfor 60 timer [14, 75]. Dette fænomen har indikeret, at Ab clearance muligvis korrelerer med koncentrationen og varigheden af H_2 i hjernen. Det vil sige, at en høj koncentration af H_2 i målvævet har en bedre performance end en lav koncentration. Med henblik på maksimering af den terapeutiske effekt af H_2 kan udvikling af effektiv opbevaring og målrettet levering af H_2 være en af de fremtidige forskningsretninger.

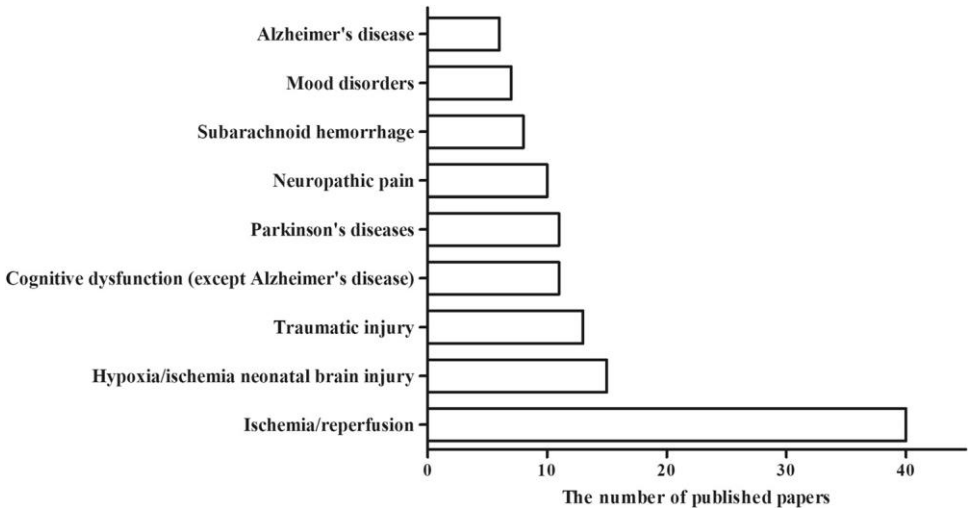

Fig. 1 Antal udgivelser (kliniske forsøg og dyreforsøg) i PubMed-databasen om brug af H_2 til forskellige neurologiske sygdomme mellem 2007-2020.

Den beskyttende effekt af H_2 i forhold til nervesystemsygdomme

Iskæmi/reperfusionsskade

Iskæmi/reperfusionsskade er en tilstand karakteriseret af vævsskade, som er forårsaget af en iskæmisk eller anoxisk periode efterfulgt af genetablering af blodforsyning til vævet. Iskæmi/reperfusionsskade i centralnervesystemet forbindes med sygdomme som slagtilfælde, hjernetraume, hjerneinfarkt og hjertestop.

Genoprettelse af cirkulation efter fravær af tilstrækkelig tilførsel af O_2 i blodet inducerer en eksplosion af reaktive oxygenarter (ROS), hvilket derefter udløser inflammatorisk respons og oxidativ skade. ROS-produktionen kan direkte ødelægge cellemembranerne ved at inducere lipidperoxidation, hvorfor antioxiderende midler anses for at være en behandlingsmulighed. For det første er H_2 blevet undersøgt som et antioxiderende middel, der kan afbøde den destruktive effekt af oxidativt stress i hjernen efter fokal iskæmi/reperfusion via selektiv reducering af cytotoksiske oxygenradikaler [3]. Det udgør det grundlag, hvorpå in vivo-studier er blevet udført for at validere den beskyttende rolle, som H_2 har i forbindelse med iskæmi/reperfusionsskade i centralnervesystemet. I dyremodeller for cerebral iskæmi/reperfusion øger inhalation af 66,7 % H_2 i væsentlig grad aktiviteten af SOD og GSH-Px, reducerer niveauet af malondialdehyd (MDA) og infarktvolumen, dæmper ødem og blødning i hjernen samt forbedrer neuroadfærdsmæssige mangler [5, 76, 77]. Iskæmi/reperfusionsskade i hjernen er en almindelig sekundær effekt af hjertestop, som er ansvarlig for mortalitet og morbiditet efter hjertelungeredning. Ved eksperimental hjertestop/genoplivning mindsker H_2-intervention også i væsentlig grad de neurologiske skader samt øger overlevelsesraten og det neurologiske resultat hos dyr [78,

Tabel 1 Den neurobeskyttende effekt af H_2 i forhold til neurologiske sygdomme og de tilhørende mekanismer.

Sygdomstype	Element	Administration af brint	Mekanisme	Referencer
Iskæmi/reperfusionsskade i CNS	Rotte, mus, kanin, svin, menneske	Inhalation, intraperitoneal injektion, oral, IV injektion	Bevarelse af BBB. Bevarelse af mitokondrisk funktion. Hæmning af påvirkning af endoplasmatisk reticulum. Antioxidation. Antiinflammatorisk. Antiapoptose (PI3K/Akt/ GSK3b-signalvej, Cyt c/caspase-3-signalvej). MikroRNA-regulering	[5, 6, 20, 29–36]
Hypoksi/iskæmisk neonatal hjerneskade	Rotte, mus, svin	Inhalation, intraperitoneal injektion	Dæmpning af oxidativt stress (MAPK/HO-1/PGC-1a-signalvej). Hæmning af påvirkning af endoplasmatisk reticulum. Fremmelse af autofagi. Regulering af mikrogliapolarisering. Forbedring af neurovaskulær dysfunktion	[37–41]
Traume i CNS	Rotte, mus	Inhalation, intraperitoneal injektion, subaraknoidal perfusion	Bevarelse af BBB. Attenuation af neuronal apoptose. Bevarelse af mitokondrisk funktion. Antioxidation. Regulering af gener, der skyldes oxidativt stress. Undertrykkelse af astrocytaktivering	[7, 8, 42–45]
Subarachnoidalblødning	Rotte, kanin	Inhalation, intraperitoneal injektion	Bevarelse af BBB. Forbedring af cerebral vasospasme. Antiapoptose (Akt/GSK3b-signalvej). Hæmning af oxidativt stress. Hæmning af NF-jB-aktivering og dannelse af NLRP3-inflammasomet	[9, 10, 46–49]
Nervesmerter	Rotte	Intraperitoneal injektion		[50–52]
Hyperalgesi			Antiinflammatorisk. Hæmning af GSK-3b-aktivitet og trafficking af NMDA-receptormembran. Hæmning af oxidativt stress (fjernelse af $ONOO^-$og blokering af MnSOD-nitration)	
Nerveskade	Rotte, mus	Intratekal infusion, oral, intraperitoneal injektion	Undertrykkelse af oxidativt stress. Hæmning af spinalastrocytter og mikrogliaaktivering. Hæmning af inflammation via aktivering af HO-1/CO-signalering. Nedregulering af p38MAPK- og BDNF-ekspression. Aktivering af autofagi via HIF-1a-signalveje	[11, 12, 25, 53, 54]
Parkinsons	Rotte, mus, menneske	Inhalation, oral	Hæmning af oxidativt stress. Forebyggelse af dopaminergt celletab. Aktivering af gastrisk ghrelinsystem	[15, 16, 23, 55–58]
Alzheimers sygdom	Rotte, mus	Oral, intraperitoneal injektion, intracerebral injektion	Opklaring af mitokondrisk dysfunktion. Forbedring af antioxiderende system via stimulation af AMPK og opregulering af Sirt1-FoxO3a-akse. Undertrykkelse af inflammatorisk respons via hæmning af aktivering af JNK, NF-jB og NLRP3. Aktivering af E_2-ERb-BDNF-signalveje	[13, 14, 31, 59–61]
Stemningsforstyrrelser	Mus, menneske	Inhalation, oral, intraperitoneal injektion	Undertrykkelse af oxidativt stress. Antiapoptose og antiinflammation. Regulering af aktiviteten af hypotalamus-hypofyse-akse	[17, 18, 62–64]

79]. Inhalation eller injektion af H_2 efter hjertestop kontrollerer effektivt neuronal død og mikrogliaaktivering i hippocampus samt reducerer niveauet af protein S100b i serum [80–82]. Hertil kommer, at det er påvist, at inhalation af H_2 alene eller i kombination med terapeutisk hypotermi er bedre end hypotermi alene [38, 80, 81, 83].

Klinisk iskæmi/reperfusion forekommer ikke ofte i forbindelse med slagtilfælde og hjerneinfarkt, hvorimod der er større sandsynlighed for udvikling af de frygtede reperfusionsskader i hjernen hos patienter, som får trombolysebehandling eller interventionstrombektomi. Endnu mere vigtigt er det, at sikkerheden og virkningen af H_2 er blevet bekræftet i kliniske forsøg med cerebral iskæmi, hjerneinfarkt og hjertestop. Hos patienter med akut cerebral iskæmi kan inhalation af 3 % H_2 i 30 min. eller IV administration af H_2 leverer tilstrækkeligt H_2 til blodet uden at kompromittere sikkerheden [4, 84]. Et randomiseret, kontrolleret klinisk studie med patienter med akut hjerneinfarkt viste, at inhalation af 3 % H_2-gas i 1 time 2 gange om dagen i 7 dage forbedrede O_2-mætningen uden bivirkninger. Patienter, som behandles med inhalation af H_2,

har væsentligt mindre infarktsted, og oplever bedre opklaring af den neurologiske status og evnen til at udføre dagligdags aktiviteter i forhold til kontroller [20]. Hertil kommer, at IV administration af H_2 i kombination med edaravon har mere evident og signifikant favorabel effekt end kun administration af edaravon [85]. I et humant studie med patienter med følger efter hjertestop havde inhalation af en lav koncentration af H_2 i 18 timer en gunstig score for kategorien cerebral performance efter 90 dage, uden rapportering af bivirkninger [21]. Med henblik på yderligere evaluering af virkningen og sikkerheden af inhalation af H_2 er man i Japan i gang med et fase II-, klinisk forsøg med patienter med følger af hjertestop [22]. Selvom der ikke er fundet bivirkninger af H_2 i dyreforsøg, bør de potentielle bivirkninger undersøges yderligere, da der er indberettet diarré hos et lille antal patienter efter behandling med H_2 [84].

Hypoksi/iskæmisk neonatal hjerneskade

Hypoksi/iskæmisk neonatal hjerneskade er en primær årsag til dødsfald og invaliditet i den perinatale periode, men der er ingen effektiv behandling. Nyere studier med gnavermodeller for neonatal hypoksi/iskæmi har dog vist, at H_2 kan beskytte neonatale hjerner mod skader, der skyldes hypoksi/reoxygenering. Adskillige studier har påvist, at intraperitoneal injektion af brintberiget saltvand i væsentlig grad undertrykker autofagi og neuroinflammation, fremmer polarisering af M2-mikroglia, redder synaptisk tab og derefter genopretter adfærdsmæssige mangler hos en musemodel for hypoksi/iskæmi [39, 40]. Der er opnået lignede resultater med hypoksi/iskæmimodeller hos neonatale rotter og smågrise [37, 38]. I en rottemodel for neonatal hypoksisk-iskæmisk encefalopati er det påvist, at inhalation af H_2 reducerer infarktstørrelsen, neuronalt tab og astrocytaktivering i cortex og CA3-regionen af hippocampus [37]. Sideløbende blev de adfærdsmæssige reflekser hos neonatale rotter væsentligt forbedret efter inhalation af H_2 [86]. Et studie by Htun et al. viser, at H_2-ventilation kombineret med mild hypotermi forbedrer den neurologiske score og gangfunktionen i en 5-dags hypoksi/iskæmi-model med neonatale smågrise [38]. H_2 har ikke kun en kortvarig neurobeskyttende effekt, men også langvarige neurologiske og neuroadfærdsmæssige effekter. 10 uger efter den hypoksiske/iskæmiske irritation i en neonatal rottemodel forbedrer administration af H_2 også læring og hukommelse [37]. Den neurovaskulære enhed er nødvendig for at opretholde hjernens skrøbelige homeostase. ROS produceret i den tidligere reoxygeneringsperiode reducerer i væsentlig grad cerebrovaskulær reaktivitet og inducerer dysfunktion i den neurovaskulære enhed. H_2 bevarer cerebrovaskulær reaktivitet og dæmper udvikling og persistens af forsinket neurovaskulær dysfunktion forårsaget af hypoksisk stress hos nyfødte smågrise [41, 87]. Samlet set indikerer disse resultater, at brug af H_2 kan anses for at være en terapeutisk tilgang til neonatale hjerneskade efter asfyksi.

Traume

Incidensen af traumer i hjerne og rygmarv er konstant stigende i vore dages samfund. Selvom der er sket fremskridt inden for profylaktisk og terapeutisk behandling af traumer, er det stadig en stor udfordring af genoprette nervefunktionen. Hos dyr medfører traumer i hjerne og rygmarv blødning, ødem, celledød og inflammatorisk celleinfiltration samt forøger BBB-permeabilitet og neurologiske mangler. Behandling med H_2 forbedrer dog i væsentlig grad skader og fremmer genopretning af nervefunktionen [7, 8, 42, 88, 89].

Behandling med H_2 eller brintberiget saltvand reducerer ekspressionen af caspase-3, caspase-9 og Bax, øger ekspressionen af Bcl-2 og dæmper i væsentlig grad neuronal apoptose efter en mekanisk skade [8, 42]. Hertil kommer, at behandling med H_2 også reducerer oxidative produkter, f.eks. MDA, 8-iso-prostaglandin F2a, 8-hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) og carbonylprotein, øger den endogene antioxiderende enzymaktivitet (SOD, CAT og GPx), undertrykker niveauet af MPO, NOX2 og NOX4 samt eleverer Sir2, PrxIII, Trx2 og CGRP i forbindelse med kontuderet hjerne og rygmarv [42, 45, 90, 91]. Herudover har Dohi et al. påvist, at behandling med brintberiget vand reverserer ekspressionen af de gener, der indgår i oxidativt stress, kulhydratstofskiftet og neuroinflammation efter en traumatisk hjerneskade [43]. Endvidere kontrollerer behandling med brintberiget saltvand den inflammatoriske proces i hjernevævet hos rotter med en traumatisk hjerneskade ved at reducere niveauet af proinflammatoriske cytokiner (TNFa, IL-1b og HMGB-1) samt antallet af inflammatoriske celler (Iba1) og inflammatoriske metabolitter (Cho) [88, 89]. Herudover kan H_2-molekyler endda tilsyneladende undertrykke reaktiv astrogliose, hvilket hører sammen med oxidative skader i rygmarven [44]. I den kontuderede rygmarv hos rotter dæmper brintberiget saltvand bemærkelsesværdigt lokal frigivelse af proinflammatoriske cytokiner og produktionen af specifikke markører (STAT3, p-STAT3 og GFAP), som udtrykt af astrocytter, samt undertrykker astrogliose [44].

Overlevende efter en traumatisk hjerneskade oplever ofte kognitiv svækkelse, herunder nedsat læring og hukommelse. Disse mangler kan reverseres via behandling med brintberiget saltvand, sådan som det indikeres via forbedret kognitiv performance i Morris' vandlabyrint efter milde traumatiske hjerneskader ved forekomst af brintberiget saltvand [91]. Brintberiget saltvand kan forbedre kognitive

mangler efter traumer ved at opretholde synaptisk plasticitet. Hos rotter med en traumatisk hjerneskade øger brintberiget saltvand i væsentlig grad niveauet af hjerneafledt neurotropisk faktor (BDNF), calcium-/calmodulinafhængig proteinkinase II, synapsin I og cyklisk AMP-responselementbindende (CREB) protein i hippocampus [91]. Disse molekyler indgår i medieringen af synaptisk plasticitet og kognition. Generelt dæmper H_2 ikke kun traumatiske hjerneskader via gassens almindelige antioxiderende, antiinflammatoriske og antiapoptotiske effekt, men dæmper også kognitive skader induceret af traumatiske hjerneskader ved at forbedre neuronal synaptisk plasticitet.

Subarachnoidalblødning (SAH)

Subarachnoidalblødning (SAH) er en voldsom cerebrovaskulær hændelse med høj morbiditet og mortalitet samt en dårlig prognose. Oxidativt stress er en nøglefaktor, som indgår i patogenesen af tidlige hjerneskader efter SAH. En antioxiderende behandling, der omfatter regulering af frie radikaler, er derfor effektiv til behandling heraf. H_2 er en lovende terapeutisk metode til patienter med SAH på et tidligt stadie. Adskillige dyrestudier har vist, at behandling med brintberiget saltvand i væsentligt omfang dæmper den tidligere hjerneskade 24 timer efter SAH [9, 10]. På samme måde dæmper inhalation af 1,3 % - 2,9 % H_2 i 2 timer efter en intracerebral blødning (ICH) hos rotter hjerneødem, opretholder BBB's integritet, reducerer apoptose og neuroinflammation samt forbedrer den neurologiske funktion, med reduceret produktion af MDA, nitrotyrosin og 8-OHG i hjernen [46, 92]. H_2 har imidlertid en neurobeskyttende effekt 24 timer efter SAH (akutte fase), men ikke efter 72 timer (forsinket fase) [46]. Det er interessant, at Manaenko et al. har observeret, at inhalation af 2 % H_2 i 1 time i væsentligt omfang reducerer indholdet af vand i hjernen og forbedrer det neurologiske resultat, hvorimod inhalation af H_2 i 2 timer ikke har nogen effekt 24 timer (akutte fase) efter ICH [93]. Hertil kommer, at 72 timer efter ICH er der større sandsynlighed for, men dog ikke i signifikant grad, at inhalation af H_2 vil forbedre de neurologiske mangler. I modsætning hertil dæmper behandling med brintberiget saltvand det forøgede niveau af MDA, caspase-12 og caspase-3, og dæmper i væsentligt omfang hjerneskade og -ødem 72 timer efter SAH hos kaniner [49]. Baseret på disse rapporter kan H_2 have en dosis- og tidsafhængig effekt i forbindelse med SAH. Herudover kan H_2 forbedre cerebral vasospasme, som er en almindelig komplikation hos patienter med SAH. Hos rotter dæmper brintberiget saltvand neurologiske funktionelle mangler og morfologiske vasospasmer i a. basilaris efter SAH [47].

Nervesmerter

Nervesmerter er en smertetype, der hører sammen med skade eller sygdom, som påvirker det somatosensoriske nervesystem, og som i væsentligt omfang påvirker patientens livskvalitet. Nervesmerter er besværlige og ekstremt udfordrende at behandle. Endnu mere vigtigt er det, at behandling med H_2 kan være en terapeutisk tilgang til lindring af nervesmerter i forbindelse med forskellige patologiske tilstande, herunder opioidinduceret hyperalgesi, rygmarvsskader og postherpetisk neuralgi.

Postoperativ hyperalgesi Remifentanil, som er et potent, korttidsvirkende, syntetisk opiodanalgetikum, anvendes som tillæg til et anæstesimiddel under operationer til smertelindring. Hyperalgesi er en bivirkning af administration af intraoperativ analgesi med remifentanil. Under udviklingen af opioidinduceret hyperalgesi øges NMDA-receptor NR1- og NR2B-underenhedernes membran-trafficking i rygmarven, og denne trafficking medieres via aktivering af glykogensyntase kinase-3b (GSK-3b) [51]. Zhang et al. har observeret, at remifentanil-infusioner inducerer hurtig og langvarig mekanisk og termisk hyperalgesi og fremmer trafficking af NR1-membranen samt aktivering af GSK-3b i ganglion radix dorsalis (DRG) [51]. Endnu vigtigere er det, at behandling med brintberiget saltvand delvist dæmper remifentanil-induceret hyperalgesi uden at påvirke baseline for den smerteførende grænseværdi, sænker ekspressionen af inflammatoriske mediatorer (TNF-a, IL-1b og IL-6) samt undertrykker trafficking af NR1-membranen via hæmning af GSK-3b-aktivitet i DRG på en dosisafhængig måde [51]. I en rottemodel for incisionelle postoperative smerter forøges produktionen af $ONOO^-$ i rygmarven efter administration af remifentanil. ONOO aktiverer divalent metaltransporter 1 uden et jernresponsivt element [DMT1(-)IRE] og inducerer unormal jernophobning, hvilket fører til udvikling af hyperalgesi [50]. Intraperitoneal levering af brintberiget saltvand kan fjerne $ONOO^-$ fra rygmarven, beskytte mod remifentanil-induceret postoperativ hyperalgesi og dæmpe DMT1(-)IRE-aktivering og ophobning af jern [50]. Herudover dæmper efterbehandling med brintberiget saltvand den postoperative mekaniske og termiske hyperalgesi, der er induceret af remifentanil, i forbindelse med incisionelle smerter hos rotter, forbyder NR2B-ekspression og membran-trafficking fra den intracellulære pool til overflade-poolen samt blokerer MnSOD-nitration i baghornet [52]. Disse resultater indikerer, at brintberiget saltvand har en antihyperalgesisk effekt, muligvis via hæmning af oxidativt stress og GSK-3bNMDA-MnSOD-signalvejen (fig. 2).

Nervesmerter efter en nerveskade Resultatet af et studie vedrørende nervesmerter induceret af L5

spinalnerveligering (L5 SNL) i en rottemodel viser, at intratekal infusion af brintberiget saltvand dulmer L5 SNL-induceret mekanisk allodyni og termisk hyperalgesi samt giver en relativt langvarig forebyggende effekt [25]. Ved kroniske forsnævringsinducerede skader i en anden rottemodel for nervesmerter forøger intratekal eller intraperitoneal injektion af brintberiget saltvand også i væsentligt omfang grænseværdien for mekanisk tilbagetrækning og latens for termisk tilbagetrækning for nervesmerter [11, 53]. I en musemodel for delvis iskiasnerveligering dæmper indtagelse af vand med H_2 også i væsentligt omfang mekanisk allodyni og termisk hyperalgesi [12]. Udover oxidativt stress udløses smerter også af inflammation og aktivering af immunceller og glialceller i DRG [94]. Den analgesiske effekt af H_2 kan muligvis også høre sammen med undertrykkelse af inflammation og oxidativt stress. Administration af H_2 hæmmer aktiveringen af spinale astrocytter og mikroglia, reverserer overekspressionen af proinflammatoriske cytokiner (IL-1b, TNF-a og HMGB) og sænker niveauet af tyrosin-nitreret MnSOD, MDA, proteincarbonyl, 8-hydroxyguanosin (8-OHG), 8-OHdG, HNE og MPO (fig. 2) [12, 25, 53, 54]. I en rottemodel for ligering af iskiasnervestammen dæmper behandling med brintberiget saltvand

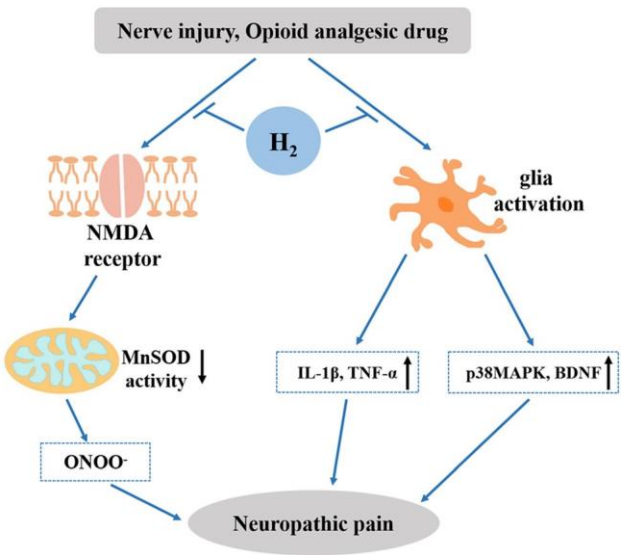

Fig. 2 Den beskyttende effekt af H_2 mod nervesmerter og de relaterede mekanismer.

smerter, sænker niveauet af proinflammatoriske cytokiner samt øger HO-1-proteinekspression og -aktivitet i DRG og rygmarven. Sideløbende reverseres effekten af H_2 af HO-1-hæmmeren SnPP-IX og forstærkes yderligere af hemin og CORM-2. Chen et al. har derfor indikeret, at HO-1/CO-signalering indgår i den analgesiske og antiinflammatoriske effekt af H_2 i forbindelse med nervesmerter [54].

Parkinsons sygdom

Parkinsons er den næstmest almindelige neurodegenerative lidelse, og den påvirker primært bevægelsessystemet. Sygdommen er karakteriseret af progressiv degeneration af dopaminerge neuroner i pars compacta i substantia nigra. Til dato har adskillige dyreforsøg og en håndfuld forsøg med mennesker vist, at H_2 har en dæmpende effekt på udviklingen af Parkinsons.

Et randomiseret, dobbeltblindet, placebokontrolleret forsøg med 18 patienter fandt, at patienter, der drak brintberiget vand i 48 uger, opnåede en forbedring i den samlede UPDRS-score (Unified Parkinson's Disease Rating Scale), mens UPDRS-scoren hos patienter, som drak vand med placebo, blev forværret. De foreløbige resultater indikerer, at indtagelse af brintberiget vand er sikkert og tåles godt. Hertil kommer, at det har en væsentlig indvirkning på Parkinsons sygdom [23]. Et andet klinisk forsøg med 20 patienter med Parkinsons, viste dog, at inhalation af 1,2 % - 1,4 % H_2 i 10 min. 2 gange om dagen i 4 uger ikke havde nogle gavnlig effekt [95]. Og desværre forbedrede indtagelse af brintberiget vand i 72 uger heller ikke den samlede UPDRS-score hos 178 patienter med Parkinsons i forbindelse med et randomiseret, dobbeltblindet multicenterforsøg [96]. Selvom der ikke var nogen væsentlige forskelle i ændringen af scoren i gruppen, der drak brintberiget vand, og i placebogruppen i dette forsøg, påviste forsøget endnu en gang sikkerheden ved indtagelse af brintberiget vand [96]. Disse negative resultater kan skyldes graden af Parkinsons sygdom, UPDRS-scorens fase, H_2-koncentrationen i det brintberiget vand eller varigheden af inhalation af H_2.

I 6-hydroxydopamin- eller 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6tetrahydropyridin (MPTP)-gnavermodeller for Parkinsons sygdom er administration af H_2 effektivt til at hæmme sygdommens udvikling og progression [16, 55–57]. Yderligere analyse har vist, at den terapeutiske effekt af H_2 i modeller for Parkinsons sygdom kan høre sammen med forebyggelse af tab af dopaminerge neuroner i substantia nigra samt et fald i produktionen af 4-HNE i de SN-dopaminerge neuroner og ophobning af 8-oxoguanin i striatum (fig. 3) [16, 55, 57].

H_2 er en de primære tarmgasser, som produceres og anvendes af mikrobiota i tarmene. Tarmens mikrobiota er tæt forbundet med Parkinsons [97]. Det betyder, at forholdet mellem hjerne og tarm under behandling med H_2 er blevet et

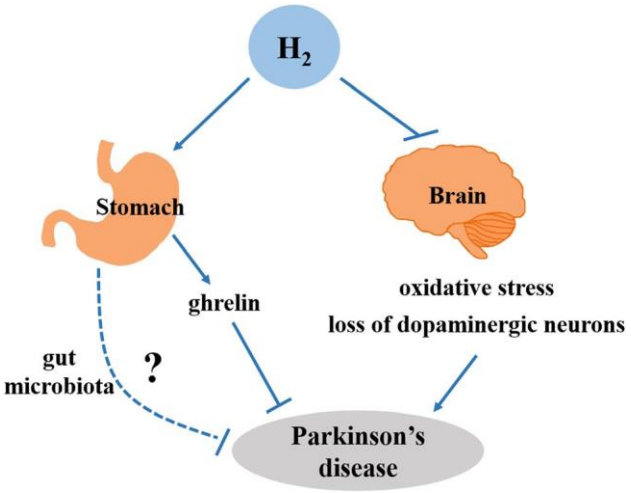

Fig. 3 Den neurobeskyttende effekt af H_2 ved Parkinsons.

interessant emne. Matsumoto et al. rapporterede, at oral indtagelse af brintberiget vand i væsentlig grad øger ghrelingenekspression i maven samt niveauet af ghrelin i plasma hos mus. Endnu vigtigere er det, at aktivering af den b1-adrenerge receptor er påkrævet, for at H_2 kan inducere en stigning af ghrelin i plasma [58]. Det betyder, at studier har vist, at indtagelse af brintberiget vand kan forbedre Parkinsons sygdoms patologiske proces via aktivering af det gastriske ghrelinsystem (fig. 3) [58]. Der er anvendt ghrelin-knockout-mus (KO) for yderligere at validere ghrelins bidrag i musemodellen for H_2-behandlet Parkinsons sygdom. Yoshii et al. har observeret, at administration af brintberiget vand i væsentligt omfang reducerer tabet af dopaminerge celler i ghrelin-KO-mus med MPTP-irritation [15]. Herudover er administration af D-Lys^{3}GHRP-6 ikke effektivt i forhold til at hæmme den neurobeskyttende effekt af H_2 hos ghrelin-KO-mus med Parkinsons, modsat mus af vild-type [15]. De mente derfor, at ghrelin ikke er den eneste faktor, der er forbundet med den H_2-inducerede neurobeskyttende effekt i forbindelse med Parkinsons (fig. 3) [15], og der er behov for flere studier for at undersøge forholdet mellem hjerne og mave under behandling med H_2. Mikako et al. har observeret, at indtagelse af den H_2-producerende forløber lactulose (substrat for mikrobiel fermentering) øger koncentrationen af H_2 i åndedrættet og forbedrer i meget lille grad de motoriske mangler i en rottemodel for Parkinsons [56]. Det ser ud til, at tarmens mikrobiota medierer kommunikation mellem tarm og hjerne via mikrobielle metabolitter, herunder H_2 [98], eller H_2 modulerer måske dysbiose i tarmens mikrobiota i forbindelse med Parkinsons (fig. 3).

Kognitiv dysfunktion (Alzheimers sygdom)

Alzheimers sygdom er den mest almindelige neurodegenerative lidelse i verden, og er den primære årsag til demens hos ældre. Kvinder rammes oftere end mænd. Behandling med H_2 kan være et muligt valg til patienter med denne sygdom, da det har været rapporteret, at H_2 forbedrer den kognitive svækkelse i dyremodeller for denne sygdom. I mange kredse mener man, at ophobning af Ab-aflejringer er den grundlæggende årsag til Alzheimers. Intracerebral injektion af Ab1-42 hos hanrotter øger niveauet af oxidativt stress i hjernevæv, hvilket indikerer et øget niveau af MDA og 8-OHdG [59, 60]. I en transgen musemodel for Alzheimers har administration af H_2 en beskyttende effekt [13, 14]. Indtagelse af brintberiget vand reducerer i væsentlig grad niveauet af MDA og forbedrer aktiviteten af T-SOD og GSH hos APP/PS1-mus [13]. I mus med 3 9 Tg Alzheimers sygdom regulerer en intracerebral injektion af PdH-nanopartikler (en H_2-bærer med høj nyttelast) effektivt OH, reducerer Ab-generation og -aggregation, forbedrer mitokondrisk dysfunktion, reverserer de synaptiske mangler og hæmmer neuronal død i hjernen [14]. In vitro øger behandling med H_2 det antioxiderende system i humane neuroblastome SK-N-MC-celler under Ab-stimuleret oxidativt stress via stimulering af AMPK og opregulering af downstream Sirt1-FoxO3a-aksen. Det forebygger mitokondrisk dysfunktion, hvorved celleoverlevelse ultimativt opretholdes (fig. 4) [61].

H_2 forbedrer kognitiv svækkelse i gnavermodeller for Alzheimers, ikke kun via reducering af oxidativt stress, men også via undertrykkelse af den inflammatoriske respons i hjernen. Administration af H_2 forebygger effektivt omfattende neuroinflammation i Ab1-42-udfordrede mus, med undertrykkelse af astrocytaktivering og hæmning af proinflammatoriske faktorer (IL-1b, IL-6 og TNF-a) i hjernen [59, 60]. Hos APP/PS1-mus reducerer indtagelse af vand med H_2 niveauet af mRNA for IL-6 og TNF-a i hjernen (fig. 4) [13]. Det indikerer en antiinflammatorisk effekt af H_2.

Det er interessant, at H_2 har en kønsspecifik kognitiv fordel hos APP/PS1-mus uden at ændre Ab clearance og APP-bearbejdning. Oral brintberiget vand er effektivt til rumligt at forbedre læringsmangler, svækket hukommelse og østrogenniveauet (E_2) i både hjerne og serum samt at øge ekspressionen af ERb, BDNF og TrkB i hjernen hos hun-APP/PS1-mus, men ikke han-APP/PS1-mus. Det er i overensstemmelse med nyere studier, som viser, at hun-3 9 Tg-AD-mus udviser mere udpræget amyloid plak, neurofibrillær sammenfiltring, neuroinflammation og rumlige kognitive mangler end han-3 9 Tg-AD-mus [99]. Disse data indikerer, at den mekanisme, der ligger til grund for den gavnlige effekt af H_2, sandsynligvis er via E_2-ERb-

BDNF-signalvejen (fig. 4) [13]. Ved hjælp af en musemodel for præmaturt ovariesvigt induceret af zona pellucida 3 observerede He et al., at brintberiget vand forbedrer niveauet i serum af anti-Müllerian-hormon samt reducerer granulosacelleapoptose, og derved udøver en beskyttende effekt i forhold til ovariefunktion [100]. Herudover producerer ovarierne primært E_2. Vi gættede derfor på, at H_2 lindrer kognitiv svækkelse ved at forbedre ovariefunktionen hos hunmus med Alzheimers (fig. 4). Den præcise

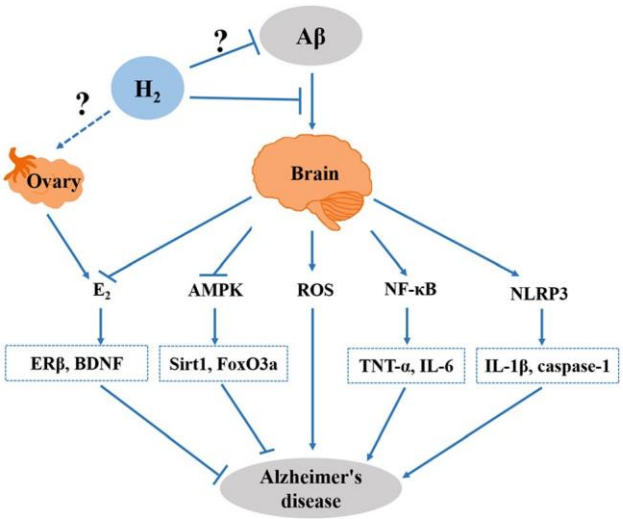

Fig. 4 Molekylære mekanismer i H_2 i forhold til forbedring af Ab-induceret Alzheimers sygdom.

i koncentrationen af Ab42 og APP, og ej heller øgede proteinekspressionen af NEP og IDE i cortex cerebri [13]. Disse fænomener indikerer, at H_2 ikke indvirker på Ab clearance og APP-bearbejdning hos APP/PS1-mus. H_2 kan med andre ord forbedre den kognitive svækkelse, men kan muligvis ikke hæmme eller reversere sygdomsprogression.

Udover forbedring af den kognitive dysfunktion ved Alzheimers dæmper H_2 også den kognitive svækkelse, der induceres af operation, isoflurananæstesi, vaskulær demens, hypoksi, stråling, stress, status epilepticus og aldring [39, 78, 101–108], som ikke gennemgås her.

Stemningsforstyrrelser

Stemningsforstyrrelser (f.eks. angst og depression) er almindelige, men alvorlige mentale helbredsproblemer over hele verden, som har en negativ konsekvens for menneskers humør, dagligdag, arbejde og social kommunikation. De fleste af de tilgængelige angstmedicin- og antidepressivatyper er generelt sikre og effektive. Men > 50 % af patienterne opnår ikke komplet remission efter medicinsk behandling. Herudover har disse lægemidler bivirkninger og advarsler vedrørende brugen.

I de senere år har dyreforsøg vist, at H_2 har en angstdæmpende og depressionsdæmpende effekt. Inhalation af 67 % H_2 eller indtagelse af 4 ml oral brintberiget vand

mekanisme for, hvorfor H_2 forebygger faldet i E_2, er dog ukendt og skal undersøges yderligere. Der er rapporteret overekspressionen af BDNF, TrkB og synaptiske proteiner (postsynaptisk densitet 95, synapsin I og synaptofysin) [13, 14] i musemodeller for Alzheimers efter behandling med H_2, hvilket indikerer, at H_2 potentielt har en neurobeskyttende effekt via genopretning af neuronal plasticitet. Hos APP/PS1-mus fandt forskerne også, at oral brintberiget vand ikke medførte fald

dagligt forebygger i væsentlig grad depressiv og angstlignende adfærd hos mus, der udsættes for kronisk mild stress (CMS) [17, 62], en gnavermodel for depression [109]. På den anden side undertrykker behandling med H_2 stigningen i IL-1b, caspase-1 og ROS i hippocampus og den præfrontale cortex hos deprimerede mus [62]. Modsat reducerer administration af H_2 også niveauet i serum af kortikosteron (CORT), ACTH, IL-6 og TNF-a hos CMS-udfordrede mus [17]. Hertil kommer, at H_2 potentielt har en langvarig effekt i forhold til stressresiliens hos mus, da inhalation af H_2 hos unge dyr i væsentligt omfang øger resiliens overfor akut stress i de tidlige voksenår [17]. Angst er en negativ psykologisk konsekvens af seponering af opioider, som kan dæmpes via administration af H_2. I en morfinafhængig musemodel for naloxonaccelereret seponering fandt Wen et al., at administration af brintberiget saltvand ikke kun i væsentlig grad reducerer tabet af kropsvægt, hoppeadfærd og våd-hund-rysten, men også undertrykker angstlignende adfærd hos mus efter naloxonaccelereret seponering eller en spontan seponeringsperiode [63]. Behandling med brintberiget saltvand reverserer sågar hypothalamus-hypofyse-adrenal-aksens hyperaktivitet, som induceres af seponering af morfin, og hæmmer stigningen i plasma af niveauet af CORT og kortisol. I en musemodel for autisme forbedrer præ- og postadministration af brintberiget vand i væsentligt omfang valproinsyreinduceret angstlignende adfærd og sænker niveauet i serum af IL-6 og TNF-a hos museunger [64].

Med henblik på yderligere validering af den unikke rolle, som H_2 har i forhold til emotionel regulering, er der udført et dobbeltblindet, placebokontrolleret studie med 31 voksne frivillige i alderen 20-49 år. Mizuno et al. observerede, at indtagelse af brintberiget vand i 4 uger i væsentlig grad reducerer (post- versus præbehandling) scoren for K6 (humør og angst), Chalder Fatigue-skalaen (sværhedsgraden af fatigue) samt Pittsburgh Sleep Quality Index (score for generel søvnighed og søvnighed i dagtimerne) [18]. Herudover var ændringerne i post-/præbehandlingsforholdet for K6-score og lavfrekvent komponenteffekt (aktivitetstest for sympatetiske nerver) væsentligt lavere i gruppen, der drak brintberiget vand, end i placebogruppen. Det indikerer, at administration af brintberiget vand kan være en effektiv

metode til at højne livskvalitet og opretholde et godt helbred ved at forbedre humør, angst og det autonome nervesystems funktion i dagligdagen.

Mekanismer bag den H_2-inducerede neurobeskyttende effekt

Der kan indgå adskillige potentielle mekanismer i den neurobeskyttende effekt, som H_2 har mod neurologisk sygdom: antioxiderende, antiinflammatorisk, antiapoptose, regulering af autofagi, bevarelse af mitokondrisk funktion og bevarelse af BBB-integritet.

Den antioxiderende effekt af H_2

Mange sygdomme er knyttet til skader, der skyldes oxidativt stress, som stammer fra en ubalance mellem produktion og regulering af ROS. Den omfattende produktion af peroxider og frie radikaler kan beskadige cellekomponenter, herunder proteiner, lipider og DNA. H_2 er anerkendt i vide kredse som en antioxidant via direkte neutralisering af cytotoksisk OH og $ONOO^-$ (fig. 5B), mens det ikke påvirker andre former for ROS, f.eks. superoxidanion (O_2^-), nitrogenoxid (NO) og hydrogenperoxid (H_2O_2), som alle har en fysiologisk rolle som signalmolekyler[3]. Aktuelt foreslår nogle forskere, at H_2 måske har en antioxiderende effekt ved at fungere upstream for genereringen af ROS. ROS stammer primært fra elektrontransportkæden under processen med oxidativ fosforylering (fig. 5). Samtidigt har mitokondrisk kompleks I tæt homologi og et evolutionsforhold med [NiFe]-hydrogenaser. Toru Ishibashi foreslog derfor, at funktionen af H_2 kan være som ensretter af det mitokondriske elektronflow for at konvertere ubiquinon til ubiquinol, og derved undertrykke omfattende elektronudsivning og ROS-generering [110]. Et nyt studie udført af Ishibashi

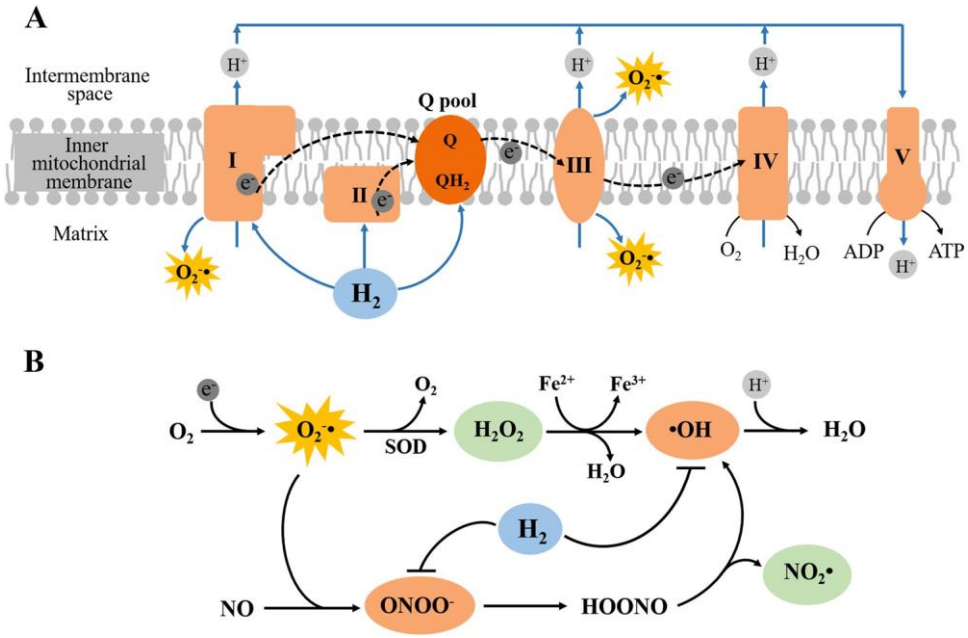

Fig. 5 Hypoteser om de antioxiderende mekanismer for H_2. A Den nye hypotese, at H_2 undertrykker generering af ROS ved at fungere som en ensretter af det mitokondriske elektronflow i ubiquinon-poolen (Q). B Den traditionelle ''reguleringsteori'' om, at H_2 direkte neutraliserer OH og $ONOO^-$ produceret af den mitokondriske respirationskæde. De mitokondriske komplekser I-V er mærket I, II, III, IV og V. QH_2, ubiquinol. HOONO, peroxynitrous syre. NO_2, nitrogendioxid.

observerede, at H_2 undertrykker generering af superoxid i kompleks I og reducerer det mitokondriske membranpotentiale (DWm) [111]. Samtidig rapporterede Gvozdjáková et al. også, at indtagelse af brintberiget vand øger niveauet af produktion af mitokondrisk ATP via kompleks I- og II-substrat og øger niveauet af mitokondrisk oxideret coenzym Q (ubiquinon) i rotters hjertevæv [112]. De seneste resultater fra Professor Mas forskningsteam påviste, at den udviklingsmæssige aktivitet af H_2 i eukaryotisk mitochondria er tæt forbundet med kompleks I, og aktiviteten forekommer omkring stedet for den komplet oxiderede ubiquinonbinding [113]. Herudover har de også observeret, at H_2 i væsentligt omfang øger aktiviteten af mitokondrisk kompleks I under hypoksiske forhold [114]. Disse resultater forstærker derved hypotesen om, at H_2 kan kontrollere generering af ROS ved kilden ved at fungere som en ensretter af det mitokondriske elektronflow i Q-kammeret (fig. 5A).

Bortset fra gassens egenskaber som regulator af frie radikaler og ensretter af den mitokondriske respirationskæde kan H_2 også øge kroppens modstandsdygtighed overfor omfattende oxidativt stress ved at forbedre niveauet af antioxiderende enzymer og modulere ekspressionen af redoxrelaterede gener. Behandling med H_2 øger endogene antioxiderende enzymers aktivitet i hjerne og rygmarv, f.eks. SOD, CAT og GPx [29, 47, 115-117]. Hertil

kommer, at H_2 kan regulere ekspressionen af antioxiderende gener. Via RNA-sekventering og RT-PCR-analyse fandt Chen et al., at ekspressionen af gener, der hører sammen med oxidativt stress, herunder Cox8b, Cox6a2, Cox7a1, Hspb7 og Atp2a1, nedreguleres i stort omfang efter behandling med H_2 hos mus med rygmarvsskader [42]. I en model for hypoksi/reoxygeneringsskade fremmer administration af H_2 i væsentligt omfang ekspressionen af HO-1 og nNOS [36, 115]. Kraftig ekspression af HO-1 er også rapporteret efter behandling med brintberiget saltvand i en rottemodel for ligering af iskiasnervestammen [54]. Nrf2 er en essentiel faktor for det endogene antioxiderende system, som har flere neurobeskyttende roller i forbindelse med flere neurologiske sygdomme via regulering af produktionen af adskillige cytobeskyttende proteiner [118]. Yuan et al. har rapporteret, at administration af brintberiget saltvand øger Nrf2-ekspressionen, fremmer translokation af Nrf2 fra cytoplasmaet til kernen og øger ekspressionen af downstream-faktorer, f.eks. HO-1 og NQO1 [7]. Samtidig er der observeret øget ekspression af p-p38 MAPK, HO-1 og Nrf2 ved behandling med H_2 i flere eksperimenter in vitro og in vivo [37, 119]. Behandling med H_2 inducerer derfor muligvis adaptive reaktioner på oxidativt stress i nervesystemet ved at evokere det antioxiderende Nrf2-forsvarssystem.

Antiinflammatoriske effekt af H_2

Omfattende studier har ført til solid evidens for, at H_2 har en antiinflammatorisk effekt i forhold til forskellige sygdomme i nervesystemet. Behandling med H_2 undertrykker i høj grad mikrogliaaktivering og sekretion af proinflammatoriske cytokiner (IL-1b, IL-6, TNF-a og HMGB-1) i dyremodeller for flere neurologiske sygdomme [5, 26, 120, 121]. In vitro hæmmer forbehandling med et H_2-beriget medie i væsentlig grad astrocytters hypertrofi og proliferation, mildner ekspressionen af GFAP og svækker den øgede sekretion af proinflammatoriske cytokiner (IL-1b, IL-6 og TNF-a) i primære astrocytter efter H_2O_2-inducerede skader [44]. H_2 hæmmer ikke blot ekspressionen af proinflammatoriske faktorer effektivt, men øger også de immunsuppressive cytokiner IL-10, TGF- b og YM-1 i hjernen [39, 88]. M1/M2-polariseringen af mikroglia er en vigtigt deltager i neuroinflammation [122]. Ning et al. har rapporteret, at behandling med H_2 i markant grad hæmmer andelen af M1-mikroglia, men ikke påvirker M2-mikroglia in vitro [123]. Chu et al. har bemærket det fænomen, at antallet af M1-mikroglia reduceres i væsentligt omfang, og antallet af M2-mikroglia øges i væsentligt omfang i cortex efter behandling med brintberiget saltvand hos mus med hypoksisk/iskæmisk irritation [39]. Hertil kommer, at der opnås mindre amøboid/rund mikroglia og mere intermediær mikroglia hos mus, der får H_2 i en høj koncentration[5]. Det tyder på, at H_2 kan undertrykke neuroinflammation ved at hæmme mikrogliaaktivering og regulere mikrogliapolarisering.

Den forkerte regulering af NF-jB er blevet kædet sammen med neuroinflammation. Nogle studier har indikeret, at H_2 spiller en antiinflammatorisk rolle via hæmning af NFjB-aktivering. Hos gnavere med hypoksi/iskæmi fremmer behandling med brintberiget saltvand i væsentlig grad aktivering af AMPK, hæmmer aktivering af NF-jB og fører til nedregulering af miR-21 og miR-210 i hjernen [6, 39]. I en rottemodel for subarachnoidalblødning reducerer behandling med brintberiget saltvand proteinniveauet af p-IjBa og nuklear p65 samt øger niveauet af cytosolenzym p65 [10, 48]. I en rottemodel for Alzheimers hæmmer en intraventrikulær injektion af brintberiget saltvand aktivering af JNK og NF-jB i hippocampus [60]. Hertil kommer, at indtagelse af brintberiget vand i væsentligt omfang dæmper aktivering af NLRP3-inflammasomet og reducerer ekspressionen af dets downstream signalmolekyler (spaltet caspase-1 og IL-1b) i hjernen hos hun-APP/PS1-mus [13]. Behandling med brintberiget saltvand efter en subarachnoidalblødning sænker også proteinekspressionen af NLRP3, ASC, caspase-1 og IL-1b, og spalter caspase-3 i cortex cerebri hos rotter [10]. Disse resultater indikerer, at udover modulation af NF-jB-signalvejene kan H_2 også dæmpe inflammatorisk respons ved at undertrykke dannelsen af NLRP3-inflammasomet.

Oxidativt stress kan inducere celleskader og fremme inflammation ved sygdom i CNS. Det er blevet påvist, at omfattende ROS stimulerer ekspressionen af transskriptionsfaktorer som NF-jB samt fremmer sekretionen af IL-1b via aktivering af NLRP3-inflammasomet [124, 125]. Faktisk er den antiinflammatoriske effekt af H_2 normalt parallel med den antioxiderende effekt [26, 126]. Den antiinflammatoriske effekt af H_2 kan derfor også skyldes ændringsmekanismen for genekspression, der forårsages af ROS.

Den antiapoptotiske effekt af H_2

Udover den antioxiderende og antiinflammatoriske effekt af H_2 har gassen også en antiapoptotisk effekt i forhold til nerveskader. H_2undertrykker ekspressionen af Bax, caspase-3 og andcaspase-12, fremmer ekspressionen af Bcl-2 og BclxL samt øger Bcl-2/Bax-forholdet i hjernen [9, 37, 42, 48, 101, 103, 107]. Herudover dæmper behandling med brintberiget saltvand i væsentlig grad tabet af motoriske neuroner samt hæmmer frigivelsen af mitokondrisk cytokrom c (Cyt c) og aktiveringen af downstream caspase-9 og caspase-3 [127]. Yderligere forskning har vist, at behandling med H_2 i høj grad sænker ekspressionsniveauet

af Akt, GSK3b, p-Akt og p-GSK3b i hjernevæv og cerebrale mikrovaskulære endotelceller (CMEC'er) efter hypoksi/reoxygenering [33]. Andre studier er kommet frem til lignende resultater, som viser, at behandling med brintberiget saltvand øger fosforyleringen af Akt og GSK3b efter en subarachnoidalblødning. Hertil kommer, at disse gavnlige effekter af H_2 afskaffes af Ly294002, som er en selektiv hæmmer af PI3K-signalvejen [9, 33]. Disse data antyder, at H_2 potentielt beskytter hjernen mod apoptose via Akt/GSK3b-signalvejen.

Regulering af autofagi

Nogle studier har for nylig afsløret, at H_2 kan have en neurobeskyttende effekt via regulering af signalvejen for autofagi. I en rottemodel for nervesmerter fandt Wang et al., at behandling med brintberiget saltvand dæmper hyperalgesi og aktiverer autofagi [11]. Herudover opregulerer en intraperitoneal injektion af brintberiget saltvand i væsentlig grad Beclin-I, HIF1a og BNIP3 mRNA samt proteinekspression, nedregulerer p62 mRNA og proteinekspression samt øger antallet af autofagosomer og autolysosomer i rygmarven[11]. I en rottemodel for neuralgi efter herpesinfektion lindrer intraperitoneal injektion af brintberiget saltvand neuralgi og aktiverer autofagi ved at opregulere ekspressionen af LC3, Beclin-I og p62 [128]. Herudover har Bai et al. rapporteret i forbindelse med neonatale hypoksiske/iskæmiske hjerneskader, at administration af brintberiget saltvand øger LC3II/LC3I-forholdet, øger Beclin-1-proteinekspression og sænker niveauet af fosforyleret mTOR, Stat3 og ERK i den beskadigede cortex [40]. Studier har vist, at H_2 ikke kun kan fremme autofagi, men også hæmme det. I en rottemodel for vaskulær demens reducerer indtagelse af brintberiget vand antallet af autofagosomer, hvilket ledsages af nedregulering af FoxO1- og Atg7-ekspressionniveauet, attenuation af LC3-II/I-forholdet og opregulering af p62-niveauet [101].

Bevarelse af mitokondrisk funktion

Produktionen af ROS sker primært i mitochondria, og normalt påvirkes den også. Forskere har indikeret, at brintberiget saltvand kan dæmpe neuronale skader, muligvis via bevarelse af mitokondrisk funktion. Cui et al. observerede, at brintberiget saltvand sænker graden af mitokondrisk hævelse og ultrastrukturel forstyrrelse, opretholder den mitokondriske membrans integralitet samt bevarer tabet af DWm og Cyt c-frigivelse i hippocampus hos rotter med en iskæmi/reperfusionsskade [35]. I musemodeller for amyotrofisk lateral sklerose dæmper brintberiget saltvand frigivelsen af mitokondrisk Cyt c, genopretter aktiviteten i kompleks I og IV, undertrykker dannelsen af ROS i mitochondria samt fremmer produktionen af mitokondrisk ATP [127]. Mekaniske skader beskadiger mitochondrias struktur og funktion. hvilket fører til mPTP-åbning (mitochondrial permeability transition pore) og ATP-tab i neuroner. Effekten af skaden reverseres dog af behandling med H_2 [42, 43]. I humane neuroblastome SH-SY5Y-celler fremmer forbehandling med H_2 mitokondrisk aktivitet, hvilket indikerer en stigning i DWm, cellulær ATP-koncentration og forbrugsrate for O_2 [119]. mPTP er et af de direkte steder for ROS [129]. I dette studie kan den neurobeskyttelse, der ydes af H_2, derfor muligvis knyttes til hæmning af mPTP-åbningen. Tidligere forskning indikerer, at aktiveringen af mitokondrisk ATP-sensitive $K^?$ (mitoK_{ATP})-kanaler beskytter neuroner mod beskadigelse og dødsfald forårsaget af iskæmi/reperfusion [130]. Zhou et al. gættede på, at brintberiget saltvand også aktiverer mitoK_{ATP}-kanalerne, da den gavnlige effekt af brintberiget saltvand på iskæmi/reperfusion i rygmarven delvist reverseres af 5-hydroxydcanoat, som er en selektiv mitoK_{ATP}-kanalantagonist [116]. I mellemtiden er der behov for yderligere validering af forholdet mellem H_2 og mPTP- eller mitoK_{ATP}-kanalerne.

Bevarelse af BBB

Blod-hjerne-barrieren (BBB) er en yderst selektiv og organiseret struktur, som består af endotelceller, pericytter, astrocytter, neuroner og ekstracellulær matrix. Den er også kendt som den neurovaskulære enhed, og den anses for at være centralnervesystemets portvagt [131]. Forstyrrelse af BBB forårsages primært af iskæmi/reperfusion, spontant hypertensivt slagtilfælde og mekaniske traumeinducerede nervesystemskader, og man har observeret, at H_2 dæmper BBB-dysfunktion [73, 82, 88, 90]. Takeuchi et al. fandt, at oral indtagelse af brintberiget vand reducerer antallet af 8-OHdG-positive celler og kar med blodunderløben albumin i hippocampus hos rotter med tilbøjelighed til spontant hypertensivt slagtilfælde [73]. Matrixmetalloproteinaser (MMP'er) er vigtige faktorer i forhold til forstyrrelse af BBB. Hos dyr med traumatiske hjerneskader kan indtagelse af brintberiget vand potentielt have en beskyttende effekt i forhold til ødem og forstyrrelse af BBB via undertrykkelse af faldet i niveauet af AQP-4 og MMP2 og hæmning af stigningen i niveauet af HIF-1 og MMP-9 efter kortikal påvirkning [43]. Herudover spiller hjerneafledte CMEC'er en vigtig rolle i forhold til BBB, og behandling med H_2

hæmmer CMEC-apoptose efter hypoksi/reoxygenering [33].

Konklusioner og perspektiver

Det er rapporteret, at H_2 har flere biologiske egenskaber, herunder antioxiderende, antiinflammatorisk og antiapoptotisk effekt, samt at det beskytter mitochondria og BBB. Oxidativt stress modulerer ekspressionen af mange forskellige gener, som påvirker mange biologiske reaktioner, f.eks. apoptose, autofagi og den antiinflammatoriske respons. Det betyder, at den antioxiderende effekt af H_2 kan være gassens mest grundlæggende egenskab. For indeværende er der to hypoteser vedrørende mekanismerne bag den antioxiderende effekt af H_2. Den generelt accepterede hypotese er, at H_2 direkte reagerer med OH og $ONOO^-$, dvs. den traditionelle ''reguleringsteori''. Andre mener, at H_2 undertrykker genereringen af ROS ved at fungere som en ensretter af det mitokondriske elektronflow. Selvom flere nyere udgivelser indeholder noget præliminær evidens for den nye hypotese, er der behov for mere overbevisende evidens.

Den neurobeskyttende effekt af H_2 er blevet påvist via en stadigt voksende mængde evidens fra dyreforsøg. Gassens virkning også blevet rapporteret i mange kliniske forsøg, især vedrørende cerebral iskæmi, følger efter hjertestop og Parkinsons sygdom. Selvom den beskyttende effekt af H_2 hurtigt har udviklet sig fra mange fundamentale studier til præliminær klinisk anvendelse i de senere år, er der behov for mere arbejde vedrørende de kliniske anvendelser. Utallige studier har vist, at H_2 ikke har en toksisk effekt, men der er blevet rapporteret bivirkninger i enkelte tilfælde, herunder diarré, halsbrand og hovedpine [84, 132]. Hertil kommer, at Wang et al. observerede, at t H_2-supplementering øger aktiviteten af hydrogenase i Helicobacter pylori i væsentlig grad. Endnu vigtigere er det, at højere hydrogenaseaktivitet og hydrogenmetabolisme i H. pylori kan inducere tarmkræft ved at fremme translokation af den carcinogene faktor CagA ind i værtsceller [133]. Det indikerer, at H_2 potentielt kan øge patogeners patogenitet og fremme udviklingen af sygdomme i særlige tilfælde. Det betyder, at indikationerne for og de potentielle bivirkninger af H_2 ikke kan ignoreres ved klinisk brug.

I nogle kliniske forsøg med Parkinsons sygdom havde administration af H_2 ikke nogen gavnlig effekt, hvorfor den beskyttende effekt af H_2 på en eller anden måde er begrænset under visse patologiske forhold. Som tidligere nævnt svinger distributionen af H_2 i væv og organer i henhold til administrationsmetode og påvirker derved gassens biomedicinske effekt. Det tyder på, at den begrænsede effekt af H_2 kan hænge sammen med koncentration, varighed og administrationsmetoden for H_2, foruden sygdomsstadiet. Der er derfor behov for yderligere studier til undersøgelse af farmakokinetik og forholdet mellem dosis og effekt for H_2, og derefter udvikling af mere effektive leveringsmetoder for H_2.

Overordnet set, og på trods af de begrænsede bivirkninger og negative resultater, der er rapporteret af nogle studier, kan H_2 potentielt være en lovende ny behandlingsmodalitet for adskillige sygdomme i nervesystemet.

Taksigelser Denne gennemgang blev støttet af National Natural Science Foundation of China (81770855 og 81773717), Taishan Scholarship fra regeringen i Shandong-provinsen (ts201511057) og High-Level Talent Training Program by Taishan Medical University (2018GCC08). Vi skylder Nikoli Peacher fra West Virginia University stor tak for hjælp til redigering og korrekturlæsning.

Interessekonflikt

Forfatterne erklærer, at der ikke er tale om en interessekonflikt.

Referencer

1. Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. Science 1975, 190: 152–154.
2. Gharib B, Hanna S, Abdallahi OMS, Lepidi H, Gardette B, Reggi MD. Anti-inflammatory properties of molecular hydro- gen: investigation on parasite-induced liver inflammation. C R Acad Sci III 2001, 324: 719–724.
3. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, *et al*. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. Nat Med 2007, 13: 688–694.
4. Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Sakamoto M, Kudo Y, Kaneko K, *et al*. A basic study on molecular hydrogen (H_2) inhalation in acute cerebral ischemia patients for safety check with physiological parameters and measurement of blood H_2 level. Med Gas Res 2012, 2: 21.
5. Huang J, Liu W, Manaenko A, Sun X, Mei Q, Hu Q. Hydrogen inhibits microglial activation and regulates microglial phenotype in a mouse middle cerebral artery occlusion model. Med Gas Res 2019, 9: 127–132.
6. Qian L, Pan Y, Zeng Q, Bing L, Cai S, Hui K, *et al*. Neuroprotective effect of hydrogen-rich saline in global cerebral ischemia/reperfusion rats: up-regulated tregs and down-regulated miR-21, miR-210 and NF-jB expression. Neurochem Res 2016, 41: 2655–2665.
7. Yuan J, Wang D, Liu Y, Chen X, Zhang H, Shen F, *et al*. Hydrogen-rich water attenuates oxidative stress in rats with traumatic brain injury *via* Nrf2 pathway. J Surg Res 2018, 228: 238–246.
8. Wang J, Zhang Q, Zhu K, Sun J, Zhang Z, Sun J, *et al*. Hydrogen-rich saline injection into the subarachnoid cavity within 2 weeks promotes recovery after acute spinal cord injury. Neural Regen Res 2015, 10: 958–964.
9. Hong Y, Shao A, Wang J, Chen S, Wu H, Mcbride DW, *et al*. Neuroprotective effect of hydrogen-rich saline against neurologic damage and apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage: possible role of the Akt/GSK3b signaling pathway. PloS One 2014, 9: e96212.
10. Shao A, Wu H, Hong Y, Tu S, Sun X, Wu Q, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuated subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury in rats by suppressing inflammatory response: possible involvement of NF-jB pathway and NLRP3 inflammasome. Mol Neurobiol 2016, 53: 3462–3476.
11. Wang H, Huo X, Chen H, Li B, Liu J, Ma W, *et al*. Hydrogen-rich saline activated autophagy *via* HIF-1a pathways in neuropathic pain model. Biomed Res Int 2018, 2018: 4670834.
12. Kawaguchi M, Satoh Y, Otsubo Y, Kazama T. Molecular hydrogen attenuates neuropathic pain in mice. PloS One 2014, 9: e100352.
13. Hou C, Peng Y, Qin C, Fan F, Liu J, Long J. Hydrogen-rich water improves cognitive impairment gender-dependently in APP/PS1 mice without affecting Ab clearance. Free Radic Res 2018, 52: 1311–1322.
14. Zhang L, Zhao P, Yue C, Jin Z, Liu Q, Du X, *et al*. Sustained release of bioactive hydrogen by Pd hydride nanoparticles overcomes Alzheimer's disease. Biomaterials 2019, 197: 393–404.
15. Yoshii Y, Inoue T, Uemura Y, Iwasaki Y, Yada T, Nakabeppu Y, *et al*. Complexity of stomach-brain interaction induced by molecular hydrogen in Parkinson's disease model mice. Neurochem Res 2017, 42: 2658–2665.
16. Kobayashi Y, Imamura R, Koyama Y, Kondo M, Kobayashi H, Nonomura N, *et al*. Renoprotective and neuroprotective effects of enteric hydrogen generation from Si-based agent. Sci Rep 2020, 10: 5859.
17. Gao Q, Song H, Wang X, Liang Y, Xi Y, Gao Y, *et al*. Molecular hydrogen increases resilience to stress in mice. Sci Rep 2017, 7: 9625.
18. Mizuno K, Sasaki AT, Ebisu K, Tajima K, Kajimoto O, Nojima J, *et al*. Hydrogen-rich water for improvements of mood, anxiety, and autonomic nerve function in daily life. Med Gas Res 2017, 7: 247–255.
19. Liu M, Xie F, Zhang Y, Wang T, Ma S, Zhao P, *et al*. Molecular hydrogen suppresses glioblastoma growth *via* inducing the glioma stem-like cell differentiation. Stem Cell Res Ther 2019, 10: 145.
20. Ono H, Nishijima Y, Ohta S, Sakamoto M, Kinone K, Horikosi T, *et al*. Hydrogen gas inhalation treatment in acute cerebral infarction: a randomized controlled clinical study on safety and neuroprotection. J Stroke Cerebrovasc Dis 2017, 26: 2587–2594.
21. Tamura T, Hayashida K, Sano M, Suzuki M, Shibusawa T, Yoshizawa J, *et al*. Feasibility and safety of hydrogen gas inhalation for post-cardiac arrest syndrome-first-in-human pilot study. Circ J 2016, 80: 1870–1873.
22. Tamura T, Hayashida K, Sano M, Onuki S, Suzuki M. Efficacy of inhaled hydrogen on neurological outcome following brain ischemia during post-cardiac arrest care (HYBRID II trial): study protocol for a randomized controlled trial. Trials 2017, 18: 488.
23. Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, Nakahara T, Ohta S, Hattori N. Pilot study of H_2 therapy in Parkinson's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Mov Disord 2013, 28: 836–839.
24. Yoritaka A, Abe T, Ohtsuka C, Maeda T, Hirayama M, Watanabe H, *et al*. A randomized double-blind multi-center trial of hydrogen water for Parkinson's disease: protocol and baseline characteristics. BMC Neurol 2016, 16: 66.
25. Ge Y, Wu F, Sun X, Xiang Z, Yang L, Huang S, *et al*. Intrathecal infusion of hydrogen-rich normal saline attenuates neuropathic pain *via* inhibition of activation of spinal astrocytes and microglia in rats. PloS One 2014, 9: e97436.
26. Iketani M, Ohsawa I. Molecular hydrogen as a neuroprotective agent. Curr Neuropharmacol 2017, 15: 324–331.
27. Liu B, Qin S. Different types of molecular hydrogen donors and their pharmacokinetics *in vivo*. Sheng Li Xue Bao 2019, 71: 371–377.
28. Wang Y, Li T, Cao H, Yang W. Recent advances in the neuroprotective effects of medical gases. Med Gas Res 2019, 9: 80.
29. Huang Y, Xie K, Li J, Xu N, Gong G, Wang G, *et al*. Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. Brain Res 2011, 1378: 125–136.
30. Gao Y, Gui Q, Jin L, Yu P, Wu L, Cao L, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates hippocampus endoplasmic reticulum stress after cardiac arrest in rats. Neurosci Lett 2017, 640: 29–36.
31. Wei R, Zhang R, Xie Y, Shen L, Chen F. Hydrogen suppresses hypoxia/reoxygenation-induced cell death in hippocampal neurons through reducing oxidative stress. Cell Physiol Biochem 2015, 36: 585–598.
32. Cole AR, Perry DA, Raza A, Nedder AP, Pollack E, Regan WL, *et al*. Perioperatively inhaled hydrogen gas diminishes neurologic injury following experimental circulatory arrest in swine. JACC Basic Transl Sci 2019, 4: 176–187.
33. Chen K, Wang N, Diao Y, Dong W, Sun Y, Liu L, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates brain injury induced by cardiopulmonary bypass and inhibits microvascular endothelial cell apoptosis *via* the PI3K/Akt/GSK3b signaling pathway in rats. Cell Physiol Biochem 2017, 43: 1634–1647.

34. Mo X, Li X, She C, Lu X, Xiao C, Wang S, *et al*. Hydrogen-rich saline protects rat from oxygen glucose deprivation and reperusion-induced apoptosis through VDAC1 *via* Bcl-2. Brain Res 2019, 1706: 110–115.
35. Cui Y, Zhang H, Ji M, Jia M, Chen H, Yang J, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates neuronal ischemia-reperfusion injury by protecting mitochondrial function in rats. J Surg Res 2014, 192: 564–572.
36. Hugyecz M, Mracskó E, Hertelendy P, Farkas E, Domoki F, Bari F. Hydrogen supplemented air inhalation reduces changes of prooxidant enzyme and gap junction protein levels after transient global cerebral ischemia in the rat hippocampus. Brain Res 2011, 1404: 31–38.
37. Wang P, Zhao M, Chen Z, Wu G, Fujino M, Zhang C, *et al*. Hydrogen gas attenuates hypoxic-ischemic brain injury *via* regulation of the MAPK/HO-1/PGC-1a pathway in neonatal rats. Oxid Med Cell Longev 2020, 2020: 6978784.
38. Htun Y, Nakamura S, Nakao Y, Mitsuie T, Nakamura M, Yamato S, *et al*. Hydrogen ventilation combined with mild hypothermia improves short-term neurological outcomes in a 5-day neonatal hypoxia-ischaemia piglet model. Sci Rep 2019, 9: 4088.
39. Chu X, Cao L, Yu Z, Xin D, Li T, Ma W, *et al*. Hydrogen-rich saline promotes microglia M2 polarization and complement-mediated synapse loss to restore behavioral deficits following hypoxia-ischemic in neonatal mice *via* AMPK activation. J Neuroinflamm 2019, 16: 104.
40. Bai X, Song L, Lin Y, Xie Y, Tong L, Wang L, *et al*. Hydrogen-rich saline mediates neuroprotection through the regulation of endoplasmic reticulum stress and autophagy under hypoxia-ischemia neonatal brain injury in mice. Brain Res 2016, 1646: 410–417.
41. Oláh O, Tóthszùki V, Temesvári P, Bari F, Domoki F. Delayed neurovascular dysfunction is alleviated by hydrogen in asphyxiated newborn pigs. Neonatology 2013, 104: 79–86.
42. Chen X, Cui J, Zhai X, Zhang J, Gu Z, Zhi X, *et al*. Inhalation of hydrogen of different concentrations ameliorates spinal cord injury in mice by protecting spinal cord neurons from apoptosis, oxidative injury and mitochondrial structure damages. Cell Physiol Biochem 2018, 47: 176–190.
43. Dohi K, Kraemer BC, Erickson MA, Mcmillan PJ, Kovac A, Flachbartova Z, *et al*. Molecular hydrogen in drinking water protects against neurodegenerative changes induced by traumatic brain injury. PloS One 2016, 9: e108034.
44. Liu F, Xu S, Xiang Z, Li X, Li J, Yuan H, *et al*. Molecular hydrogen suppresses reactive astrogliosis related to oxidative injury during spinal cord injury in rats. CNS Neurosci Ther 2014, 20: 778–786.
45. Ji X, Tian Y, Xie K, Liu W, Qu Y, Fei Z. Protective effects of hydrogen-rich saline in a rat model of traumatic brain injury *via* reducing oxidative stress. J Surg Res 2012, 178: e9–e16.
46. Zhan Y, Chen C, Suzuki H, Hu Q, Zhi X, Zhang JH. Hydrogen gas ameliorates oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. Crit Care Med 2012, 40: 1291–1296.
47. Yuan H, Guo S, Sheng C, Sun C, Zhang J, Sun X. Beneficial effect of hydrogen-rich saline on cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. J Neurosci Res 2012, 90: 1670–1680.
48. Zhuang Z, Sun X, Zhang X, Liu H, You W, Ma C, *et al*. Nuclear factor-jB/Bcl-XL pathway is involved in the protective effect of hydrogen-rich saline on the brain following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. J Neurosci Res 2013, 91: 1599–1608.
49. Zhuang Z, Zhou M, You W, Zhu L, Ma C, Sun X, *et al*. Hydrogen-rich saline alleviates early brain injury *via* reducing oxidative stress and brain edema following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. BMC Neurosci 2012, 13: 47.
50. Shu R, Zhang L, Wang C, Li N, Wang H, Xie K, *et al*. Spinal peroxynitrite contributes to remifentanil-induced postoperative hyperalgesia *via* enhancement of divalent metal transporter 1 without iron-responsive element-mediated iron accumulation in rats. Anesthesiology 2015, 122: 908–920.
51. Zhang L, Shu R, Wang C, Wang H, Li N, Wang G. Hydrogen-rich saline controls remifentanil-induced hypernociception and NMDA receptor NR1 subunit membrane trafficking through GSK-3b in the DRG in rats. Brain Res Bull 2014, 106: 47–55.
52. Zhang L, Shu R, Wang H, Yu Y, Wang C, Yang M, *et al*. Hydrogen-rich saline prevents remifentanil-induced hyperalgesia and inhibits MnSOD nitration *via* regulation of NR2B-containing NMDA receptor in rats. Neuroscience 2014, 280: 171–180.
53. Chen Q, Chen P, Zhou S, Yan X, Zhang J, Sun X, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuated neuropathic pain by reducing oxidative stress. Can J Neurol Sci 2013, 40: 857–863.
54. Chen Y, Chen H, Xie K, Liu L, Li Y, Yu Y, *et al*. H_2 treatment attenuated pain behavior and cytokine release through the HO-1/CO pathway in a rat model of neuropathic pain. Inflammation 2015, 38: 1835–1846.
55. Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, *et al*. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. Neurosci Lett 2009, 453: 81–85.
56. Mikako I, Masaaki H, Kazuaki Y, Sae G, Masafumi I, Masatoshi I, *et al*. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydorxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. Med Gas Res 2012, 2: 15.
57. Fujita K, Seike T, Yutsudo N, Ohno M, Yamada H, Yamaguchi H, *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 2009, 4: e7247.
58. Matsumoto A, Yamafuji M, Tachibana T, Nakabeppu Y, Noda M, Nakaya H. Oral 'hydrogen water' induces neuroprotective ghrelin secretion in mice. Sci Rep 2013, 3: 3273.
59. Li J, Wang C, Zhang JH, Cai J, Cao Y, Sun X. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid- beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. Brain Res 2010, 1328: 152–161.
60. Wang C, Li J, Liu Q, Yang R, Zhang JH, Cao Y, *et al*. Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF-jB activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease. Neurosci Lett 2011, 491: 127–132.
61. Lin CL, Huang WN, Li HH, Huang CN, Hsieh S, Lai C, *et al*. Hydrogen-rich water attenuates amyloid b-induced cytotoxicity through upregulation of Sirt1-FoxO3a by stimulation of AMP-activated protein kinase in SK-N-MC cells. Chem Biol Interact 2015, 240: 12–21.
62. Yi Z, Su W, Ying C, Wu T, Hong G, Shen X, *et al*. Effects of hydrogen-rich water on depressive-like behavior in mice. Sci Rep 2016, 6: 23742.
63. Wen D, Zhao P, Hui R, Wang J, Shen Q, Gong M, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates anxiety-like behaviors in morphine-withdrawn mice. Neuropharmacology 2017, 118: 199–208.
64. Guo Q, Yin X, Qiao M, Jia Y, Chen D, Shao J, *et al*. Hydrogen-rich water ameliorates autistic-like behavioral abnormalities in valproic acid-treated adolescent mice offspring. Front Behav Neurosci 2018, 12: 170.

65. Ji X, Zhang Q, Zheng W, Yao W. Morphological and molecular response of small intestine to lactulose and hydrogen-rich water in female piglets fed Fusarium mycotoxins contaminated diet. J Anim Sci Biotechnol 2019, 10: 9.
66. Zhao L, Wang Y, Zhang G, Zhang T, Lou J, Liu J. L-arabinose elicits gut-derived hydrogen production and ameliorates metabolic syndrome in C57BL/6J mice on high-fat-diet. Nutrients 2019, 11: 3054.
67. Hou C, Wang Y, Zhu E, Yan C, Zhao L, Wang X, *et al*. Coral calcium hydride prevents hepatic steatosis in high fat diet-induced obese rats: a potent mitochondrial nutrient and phase II enzyme inducer. Biochem Pharmacol 2016, 103: 85–97.
68. Zhou G, Goshi E, He Q. Micro/nanomaterials-augmented hydrogen therapy. Adv Healthc Mater 2019, 8: e1900463.
69. Zhu Q, Wu Y, Li Y, Chen Z, Wang L, Xiong H, *et al*. Positive effects of hydrogen-water bathing in patients of psoriasis and parapsoriasis en plaques. Sci Rep 2018, 8: 8051.
70. Shimouchi A, Nose K, Shirai M, Kondo T. Estimation of molecular hydrogen consumption in the human whole body after the ingestion of hydrogen-rich water. Adv Exp Med Biol 2012, 737: 245–250.
71. Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Sakamoto M, Kudo Y, Nakazawa J, *et al*. Hydrogen (H_2) treatment for acute erythymatous skin diseases. A report of 4 patients with safety data and a non-controlled feasibility study with H_2 concentration measurement on two volunteers. Med Gas Res 2012, 2: 14.
72. Liu C, Kurokawa R, Fujino M, Hirano S, Sato B, Li X. Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen *via* various routes. Sci Rep 2014, 4: 5485.
73. Takeuchi S, Nagatani K, Otani N, Nawashiro H, Sugawara T, Wada K, *et al*. Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in sponta- neously hypertensive stroke-prone rats. BMC Neurosci 2015, 16: 22.
74. Yamamoto R, Homma K, Suzuki S, Sano M, Sasaki J. Hydrogen gas distribution in organs after inhalation: real-time monitoring of tissue hydrogen concentration in rat. Sci Rep 2019, 9: 1255.
75. Zhao P, Jin Z, Chen Q, Yang T, Chen D, Meng J, *et al*. Local generation of hydrogen for enhanced photothermal therapy. Nat Commun 2018, 9: 1–12.
76. Chen L, Chao Y, Cheng P, Li N, Zheng H, Yang Y. UPLC-QTOF/MS-based metabolomics reveals the protective mechanism of hydrogen on mice with ischemic stroke. Neurochem Res 2019, 44: 1950–1963.
77. Huang J, Liu W, Sun X. Hydrogen inhalation improves mouse neurological outcomes after cerebral ischemia/reperfusion independent of anti-necroptosis. Med Gas Res 2018, 8: 1–5.
78. Huang L, Applegate II RL, Applegate PM, Gong L, Ocak U, Boling W, *et al*. Inhalation of high-concentration hydrogen gas attenuates cognitive deficits in a rat model of asphyxia induced-cardiac arrest. Med Gas Res 2019, 9: 122–126.
79. Huang L, Applegate II RL, Applegate PM, Boling W, Zhang JH. Inhalation of high concentration hydrogen gas improves short-term outcomes in a rat model of asphyxia induced-cardiac arrest. Med Gas Res 2018, 8: 73–78.
80. Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, *et al*. Hydrogen inhalation during normoxic resuscitation improves neurological outcome in a rat model of cardiac arrest independently of targeted temperature management. Circulation 2014, 130: 2173–2180.
81. Chen G, Chen B, Dai C, Wang J, Wang J, Huang Y, *et al*. Hydrogen inhalation is superior to mild hypothermia for improving neurological outcome and survival in a cardiac arrest model of spontaneously hypertensive rat. Shock 2018, 50: 689–695.
82. Huo T, Zeng Y, Liu X, Sun L, Han H, Chen H, *et al*. Hydrogen-rich saline improves survival and neurological outcome after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in rats. Anesth Analg 2014, 119: 368–380.
83. Wang P, Jia L, Chen B, Zhang L, Liu J, Long J, *et al*. Hydrogen inhalation is superior to mild hypothermia in improving cardiac function and neurological outcome in an asphyxial cardiac arrest model of rats. Shock 2016, 46: 312–318.
84. Nagatani K, Nawashiro H, Takeuchi S, Tomura S, Otani N, Osada H, *et al*. Safety of intravenous administration of hydrogen-enriched fluid in patients with acute cerebral ische- mia: initial clinical studies. Med Gas Res 2013, 3: 13.
85. Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Tachibana S, Chitoku S, Mukaihara S, *et al*. Improved brain MRI indices in the acute brain stem infarct sites treated with hydroxyl radical scavengers, Edaravone and hydrogen, as compared to Edaravone alone. A non-controlled study. Med Gas Res 2011, 1: 12.
86. Palanisamy A, Baxter MG, Keel PK, Xie Z, Crosby G, Culley DJ. Rats exposed to isoflurane in utero during early gestation are behaviorally abnormal as adults. Anesthesiology 2011, 114: 521–528.
87. Domoki F, Oláh O, Zimmermann A, Németh I, Tóthszuki V, Hugyecz M, *et al*. Hydrogen is neuroprotective and preserves cerebrovascular reactivity in asphyxiated newborn pigs. Pediatr Res 2010, 68: 387–392.
88. Tian R, Hou Z, Hao S, Wu W, Mao X, Tao X, *et al*. Hydrogen-rich water attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in rats. Brain Res 2016, 1637: 1–13.
89. Fu J, Lan Q, Wang D, Wang Y, Liu Y. Effect of hydrogen-rich water on the chondriosome damage and cytokines in brain tissue of rats with traumatic brain injury. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2018, 30: 317–321.
90. Ji X, Liu W, Xie K, Liu W, Qu Y, Chao X, *et al*. Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury *via* reducing oxidative stress. Brain Res 2012, 178: e9–e16.
91. Hou Z, Luo W, Sun X, Hao S, Zhang Y, Xu F, *et al*. Hydrogen-rich saline protects against oxidative damage and cognitive deficits after mild traumatic brain injury. Brain Res Bull 2012, 88: 560–565.
92. Choi K, Kim H, Do S, Hwang S, Yi HJ. Neuroprotective effects of hydrogen inhalation in an experimental rat intracerebral hemorrhage model. Brain Res Bull 2018, 142: 122–128.
93. Manaenko A, Lekic T, Ma Q, Ostrowski RP, Zhang JH, Tang J. Hydrogen inhalation is neuroprotective and improves functional outcomes in mice after intracerebral hemorrhage. Acta Neurochir Suppl 2011, 111: 179–183.
94. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat Neurosci 2007, 10: 1361.
95. Hirayama M, Ito M, Minato T, Yoritaka A, LeBaron TW, Ohno K. Inhalation of hydrogen gas elevates urinary 8-hydroxy-2′-deoxyguanine in Parkinson's disease. Med Gas Res 2018, 8: 144–149.
96. Yoritaka A, Ohtsuka C, Maeda T, Hirayama M, Abe T, Watanabe H, *et al*. Randomized, double-blind, multicenter trial of hydrogen water for Parkinson's disease. Mov Disord 2018, 33: 1505–1507.
97. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, *et al*. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. Cell 2016, 167: 1469–1480.
98. Ostojic SM. Inadequate production of H_2 by gut microbiota and Parkinson disease. Trends Endocrinol Metab 2018, 29: 286–288.
99. Yang J, Wang Z, Cai H, Yuan L, Hu M, Wu M, *et al*. Sex differences in neuropathology and cognitive behavior in APP/PS1/tau triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neurosci Bull 2018, 34: 736–746.

100. He X, Wang S, Yin C, Wang T, Jia C, Ma Y. Hydrogen-rich water exerting a protective effect on ovarian reserve function in a mouse model of immune premature ovarian failure induced by zona pellucida 3. Chin Med J (Engl) 2016, 129: 2331–2337.
101. Jiang X, Niu X, Guo Q, Dong Y, Xu J, Yin N, *et al*. FoxO1-mediated autophagy plays an important role in the neuroprotective effects of hydrogen in a rat model of vascular dementia. Behav Brain Res 2019, 356: 98–106.
102. Liu M, Yuan H, Yin J, Wang R, Song J, Hu B, *et al*. Effect of hydrogen-rich water on radiation-induced cognitive dysfunction in rats. Radiat Res 2020, 193: 16–23.
103. Li W, Yang S, Yu F, Zhao Y, Sun Z, An J, *et al*. Hydrogen ameliorates chronic intermittent hypoxia-induced neurocognitive impairment *via* inhibiting oxidative stress. Brain Res Bull 2018, 143: 225–233.
104. Nagata K, Nakashimakamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. Neuropsychopharma cology 2009, 34: 501–508.
105. Jia R, Jia N, Yang F, Liu Z, Li R, Jiang Y, *et al*. Hydrogen alleviates necroptosis and cognitive deficits in lithium–pilocarpine model of status epilepticus. Cell Mol Neurobiol 2019, 39: 857–869.
106. Gu Y, Huang CS, Inoue T, Yamashita T, Ishida T, Kang KM, *et al*. Drinking hydrogen water ameliorated cognitive impaiment in senescence-accelerated mice. J Clin Biochem Nutr 2010, 46: 269–276.
107. Li C, Hou L, Chen D, Lin F, Chang T, Li M, *et al*. Hydrogen-rich saline attenuates isoflurane-induced caspase-3 activation and cognitive impairment *via* inhibition of isoflurane-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and reduction in ATP levels. Am J Transl Res 2017, 9: 1162–1172.
108. Tian Y, Guo S, Zhang Y, Xu Y, Zhao P, Zhao X. Effects of hydrogen-rich saline on hepatectomy-induced postoperative cognitive dysfunction in old mice. Mol Neurobiol 2017, 54: 2579–2584.
109. Luo H, Liu Z, Liu B, Li H, Yang Y, Xu Z-QD. Virus-mediated overexpression of ETS-1 in the ventral hippocampus counteracts depression-like behaviors in rats. Neurosci Bull 2019, 35: 1035–1044.
110. Ishibashi T. Therapeutic efficacy of molecular hydrogen: a new mechanistic insight. Curr Pharm Des 2019, 25: 946–955.
111. Ishihara G, Kawamoto K, Komori N, Ishibashi T. Molecular hydrogen suppresses superoxide generation in the mitochondrial complex I and reduced mitochondrial membrane potential. Biochem Biophys Res Commun 2020, 522: 965–970.
112. Gvozdjáková A, Kucharská J, Kura B, Vančová O, Rausová Z, Sumbalova´ Z, *et al*. A new insight into the molecular hydrogen effect on coenzyme Q and mitochondrial function of rats. Can J Physiol Pharmacol 2020, 98: 29–34.
113. Zhang X, Zhang Z, Wei Y, Li M, Zhao P, Adzavon YM, *et al*. Mitochondria in higher plants possess H_2 evolving activity which is closely related to complex I. arXiv 2020, 2001.02132. https://arxiv.org/abs/2001.02132.
114. Ma X, Zhang X, Xie F, Zhao P, Zhang Z, Yi Y, *et al*. Bio-enzyme basis of hydrogen in biological system. Curr Biotechnol 2020, 10: 15–22.
115. Wang X, Zhang L, Zhao W, Liu T. The protective effects of hydrogen on HO-1 expression in the brainafter focal cerebral ischemia reperfusion in rats. Turk J Med Sci 2016, 46: 1534–1539.
116. Zhou L, Wang X, Xue W, Xie K, Huang Y, Chen H, *et al*. Beneficial effects of hydrogen-rich saline against spinal cord

ischemia-reperfusion injury in rabbits. Brain Res 2013, 1517: 150–160.
117. Wang T, Zhao L, Liu M, Xie F, Ma X, Zhao P, *et al*. Oral intake of hydrogen-rich water ameliorated chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rats. Toxicol Appl Pharmacol 2014, 280: 169–176.
118. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. Prog Neurobiol 2013, 100: 30–47.
119. Murakami Y, Ito M, Ohsawa I. Molecular hydrogen protects against oxidative stress-induced SH-SY5Y neuroblastoma cell death through the process of mitohormesis. PloS One 2017, 12: e0176992.
120. Shi Y, Wang G, Li J, Yu W. Hydrogen gas attenuates sevoflurane neurotoxicity through inhibiting nuclear factor j-light-chain-enhancer of activated B cells signaling and proinflammatory cytokine release in neonatal rats. Neuroreport 2017, 28: 1170–1175.
121. Liu Y, Dong F, Guo R, Zhang Y, Qu X, Wu X, *et al*. Hydrogen- rich saline ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice *via* the Nrf2-ARE signaling pathway. Inflammation 2019, 42: 586–597.
122. Qin C, Zhou L, Ma X, Hu Z, Yang S, Chen M, *et al*. Dual functions of microglia in ischemic stroke. Neurosci Bull 2019, 35: 921–933.
123. Ning K, Liu W, Huang J, Lu H, Sun X. Effects of hydrogen on polarization of macrophages and microglia in a stroke model. Med Gas Res 2018, 8: 154–159.
124. Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. Oxid Med Cell Longev 2015, 2015: 610813.
125. Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, *et al*. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. Oxid Med Cell Longev 2016, 2016: 2183026.
126. Tao G, Song G, Qin S. Molecular hydrogen: current knowledge on mechanism in alleviating free radical damage and diseases. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2019, 51: 1189–1197.
127. Zhang Y, Li H, Yang C, Fan D, Guo D, Hu H, *et al*. Treatment with hydrogen-rich saline delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurochem Res 2016, 41: 770–778.
128. Hongtao MA, Chen H, Dong A, Wang Y, Bian Y, Xie K. Hydrogen-rich saline attenuates hyperalgesia and reduces cytokines in rats with post-herpetic neuralgia *via* activating autophagy. Chin J Cell Mol Immunol 2017, 33: 155–158.
129. Pérez MJ, Ponce DP, Aranguiz A, Behrens MI, Quintanilla RA.
Mitochondrial permeability transition pore contributes to mito- chondrial dysfunction in fibroblasts of patients with sporadic Alzheimer's disease. Redox Biol 2018, 19: 290–300.
130. Arabian M, Aboutaleb N, Soleimani M, Ajami M, Habibey R, Pazoki-Toroudi H. Activation of mitochondrial K_{ATP} channels mediates neuroprotection induced by chronic morphine precon- ditioning in hippocampal CA-1 neurons following cerebral ischemia. Adv Med Sci 2018, 63: 213–219.
131. Khatri R, Mckinney AM, Swenson B, Janardhan V. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Neurology 2012, 79: S52–S57.
132. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. J Clin Biochem Nutr 2010, 46: 140–149.
133. Wang G, Romero-Gallo J, Benoit SL, Piazuelo MB, Dominguez RL, Morgan DR, *et al*. Hydrogen metabolism in *Helicobacter pylori* plays a role in gastric carcinogenesis through facilitating CagA translocation. MBio 2016, 7: e01022–01016.