

Ürolojik hastalık modellerinde hidrojen kullanımı

Hydrogen use in urological disease models

Ekrem Akdeniz

Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği

Özet

İskemi- reperfüzyon hasarı dokularda geçici veya kalıcı hasar bırakan hasta sağlığı ile yakından ilgili klinik bir durumdur. Serbest oksijen radikalleri iskemi- reperfüzyon hasarının patofizyolojisinin de önemli rol oynar. Hidroksil iyonu en güçlü serbest oksijen radikalidir. Hidrojen hem selektif olarak hidroksil iyonunu azaltarak hem de farklı doku koruyucu mekanizmalar ile iskemi- reperfüzyon hasarını engelleyici etki yapar. Günümüzde güçlü bir antioksidan olan hidrojenin doku koruyucu etkisi üzerine çok fazla araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmamızda ürolojik hastalık modellerinde hidrojen kullanılması değerlendirilerek kliniğe yansımaları ve gelecek üzerine etkileri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Hidrojen, Üroloji

Abstract

Ischemia-reperfusion injury in tissues leaving temporary or permanent damage patients' health is closely related to the clinical situation. Free oxygen radicals plays an important role in the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. Hydroxyl ion is the most powerful free radical. Reducing hydrogen and hydroxyl ions selectively and with different tissue protective mechanisms makes preventive effect on ischemia-reperfusion injury. Today, hydrogen is a powerful antioxidant that is done much research on the tissue protective effect. This study evaluated the clinical reflection of hydrogen is used in urologic diseases and their effects on the future were discussed.

Key Words: Antioxidant, Hydrogen, Urology

Geliş tarihi (Submitted): 04.04.2014

Kabul tarihi (Accepted): 27.11.2014

Yazışma / Correspondence

Ekrem Akdeniz

Atakent Bulvarı No:78/20 55200

Atakum / Samsun

Tel: 0362 311 15 00

Gsm: 0505 287 37 38

E-mail: ekremakdeniz@yahoo.com

Giriş

İskemi- reperfüzyon (İ/R) hasarı fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış, kompleks, birbiriyle ilişkileri karmaşık hücrel ve humoral olaylar dizisidir. Serbest radikaller bu olaylar dizisinde oldukça etkilidir. Hidroksil (OH) radikali serbest oksijen radikallerinin en güçlüsüdür (1,2). İn vitro çalışmalar OH⁻ radikalının hücre hasarından sorumlu temel serbest oksijen radikali olduğunu göstermiştir (3,4). Ohsawa ve arkadaşları hidrojenin OH radikali azaltarak hücreyi İ/R hasarından koruduğunu bulmuşlardır (Şekil 1) (5). Ohsawa'nın hidrojenin antioksidan özelliğini göstermesi üzerine neredeyse tüm organ-

larda hidrojenin etkilerini araştıran çalışmalar yapılmış ve deneysel çalışmalar az da olsa klinik uygulamalara girmiştir. Bu yazımızda hidrojenin ürolojik hastalık modelleri üzerine etkisini araştıran çalışmalar değerlendirilerek özetlenmiştir (Şekil 2).

Hidrojenin Kimyasal Özellikleri ve Kullanımı

Yunanca'da su oluşturan manasındaki "hydro" ve "genes" kelimelerinin birleşmesiyle oluşan hidrojen doğadaki en basit atom yapısına sahip elementtir. Hidrojen evrenin temel elementidir ve evrende % 70' den fazla hidrojen bulunmaktadır. Evrende bu kadar çok olan hidrojenin atmosferdeki oranı ise milyonda birden azdır (6). Hidrojen

renksiz, kokusuz, tatsız, metalik olmayan ve patlayıcı bir gazdır. Hidrojen, oksijen ve diğer oksidanlarla hızla reaksiyona girer ve patlar. 1937 yılındaki Hindenburg zeplin faciası hidrojen gazı patlaması sonucu oluşmuştur (Şekil 3). Hidrojen soğuk savaş döneminde nükleer silah yapımında kullanılmıştır. İki binli yılların başlarında hidrojenle çalışan araçlar üretilmiş ancak bu araçlar seri üretime geçememiştir. Günümüzde sanayide fosil yakıtı ve gübre üretiminde kullanılmaktadır. 2007 yılında Ohsawa, in vitro olarak hidrojenin serbest oksijen radikallerini azalttığını bulması üzerine hidrojen sağlık alanında klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Ohsawa'dan sonra hidrojenin ürogenital hastalıklar, endokrinolojik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, merkezi sinir sistemi hastalıkları, akciğer hastalıkları, maligniteler, alerjik reaksiyonlar gibi hastalıklar üzerine etkisini araştıran pek çok klinik çalışma yapılmıştır (7).

Hidrojenin Vücuttaki Etkileri Kullanımı ve Yan Etkileri

Hidrojen insan vücudunda endojen olarak üretilmez ve insan vücudunda hidrojenaz enzimi bulunmaz. Ancak insan barsağında yaşayan anaerobik mikroorganizmalar, hidrojenaz enzimi sayesinde hidrojen gazı oluşturur. Oluşan hidrojen akciğer yoluyla atılır (8). Hidrojen, vücutta sinyal alışverişinde sinyal molekülü olarak görev alır (9,10).

Hidrojenin doku koruyucu mekanizması için farklı görüşler vardır. Hidrojen en önemli özelliği güçlü bir antioksidan olmasıdır. Hidrojen selektif olarak OH⁻ radikali detoksifiye eder. Bu güçlü radikalın vücutta nasıl bir antioksidan sistemi olduğu bilinmemektedir (5,11). Hidrojen; katalaz, süperoksit dismutaz ve hemoksijenaz gibi antioksidan sistemlerin etkisini artırarak hücreyi korur (11,13). Hidrojen kaspaz 3 enzimini inhibe ederek hücreyi apoptozisten korur (14). Ayrıca hidrojen İL-1, İL-6, TNF-α gibi proinflatuar sitokinlerin salınımını engelleyerek hücreyi oksidatif strese korur (15,16).

Hidrojen gazının patlayıcı özelliği 527 santigrad derece üzerinde ise ortaya çıkar. Ortamdaki oranı % 4'ün üzerinde ise tehlikelidir. % 1-4 oranındaki hidrojen inhalasyon yoluyla güvenle kullanılabilir (17).

Hidrojen inhale, oral, intravenöz, epidermal topikal ajan veya göz damlası şeklinde kullanılabilir (7). Hidrojen inhalasyon yoluyla yüz maskesi, ventilatör veya nazal

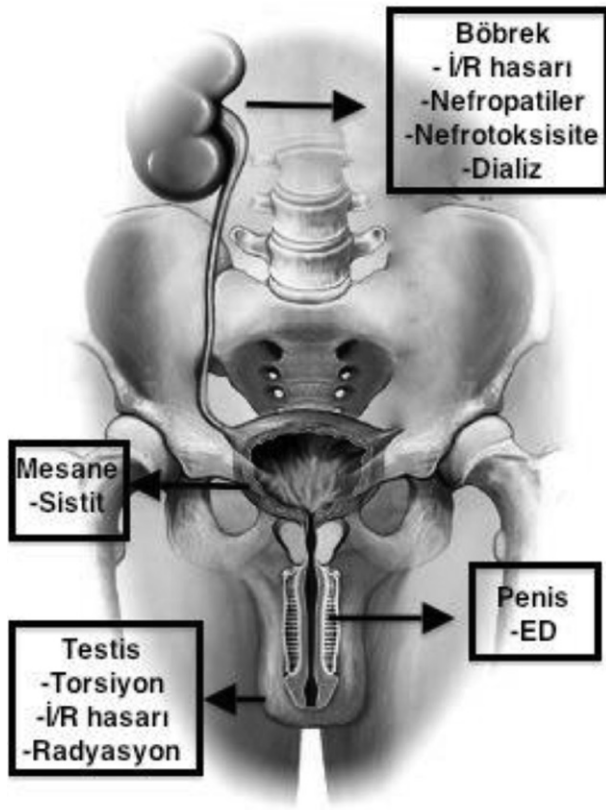


Şekil 1. Hidrojenin antioksidan özelliği Ikuroh Ohsawa tarafından bulunmuştur (Fotoğraf Dr. Ohsawa'nın izniyle kullanılmıştır).

kanül aracılığıyla kullanılabilir (17). Günlük yaşamda inhale hidrojen kullanılması zor olduğu için hidrojenden zengin su oral olarak içilebilir. Hidrojenden zengin suyun, inhale hidrojenle karşılaştırılabilir etkisi vardır (18). Hidrojenden zengin mayi doğru konsantrasyonlar da intravenöz olarak uygulanabilir (7).

Yapılan çalışmalarda suda 0,45 – 0,57 milimol arasında hidrojen bulunması güvenli bulunmuştur (19). Deneyisel rat modelinde ratlara toksik dozda oral yoldan hidrojenli su verilmiştir. Dişi ratlarda bazofili izlenmiştir. Erkek ratlarda ise aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeyinde azalma görülmüştür. Ancak bu değişimler normal klinik parametreler arasında olmuştur. Bazı dişi ratlarda dalağın ağırlığının arttığı görülmüş ancak otopside ve histopatolojik incelemelerde önemli değişiklikler bulunamamıştır (19).

İnsanlara hidrojenden zengin su verilerek yapılan çalışmada ise aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeyinde düşme; gama-glutamil transferaz ve total bilirubin düzeyinde artış izlenmiştir. Ancak bu değişimler normal klinik parametreler arasında olmuştur (20).



Şekil 2. Ürolojik hastalık modellerinde hidrojenin kullanılması (İ/R: İskemi reperfüzyon, ED: Erektile Disfonksiyon)

Hidrojenin Ürolojik Hastalık Modelleri Üzerine Etkileri

Böbrek

İ/R dokularda geçici veya kalıcı hasar bırakan hasta sağlığı ile yakından ilgili klinik durumdur (21). Yapılan çalışmalarda hidrojenin deneysel böbrek İ/R modelinde doku koruyucu etkisi olduğu görülmüştür (22-25). Bu çalışmaların tamamı ratlar üzerinde yapılmıştır. Sıcak iske mi modeli oluşturarak Wang ve arkadaşları intraperitoneal, Zhu ve arkadaşları oral, Akdeniz ve arkadaşları inhalasyon yoluyla hidrojen vermişler ve hidrojenin böbrek üzerinde biyokimyasal veya histolojik olarak doku koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir (22-24). Abe ve arkadaşları ratlar üzerinde böbrek nakli yapmışlar ve Wisconsin Üniversitesi solüsyonuna hidrojenden zengin mayı ekleyerek soğuk iske mi modelinde hidrojenin etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında hidrojenin hem greft dokusunu koruduğu hem de ömrünü uzattığını bulmuş-

lardır (25). Hidrojen cerrahi sırasında iske mi oluşturulan parsiyel nefrektomi, böbrek nakli ve böbrek vasküler cerrahisi gibi işlemlerde İ/R hasarına bağlı doku kaybını azaltarak hasta sağlığı açısından fayda sağlayabilir.

Hidrojen değişik nefropati çeşitlerinde de kullanılmış ve yüz güldürücü sonuçlar elde edilmiştir. Gu ve arkadaşları deneysel olarak rabdomiyolize bağlı akut böbrek yetmezliği oluşturmuşlar ve intraperitoneal olarak hidrojen vermişlerdir. Hidrojenin akut böbrek yetmezliğinde biyokimyasal ve histolojik olarak doku koruyucu etkisi olduğu görülmüştür (26). Cardinal ve arkadaşları ise böbrek nakli sonrası allograft nefropatisini araştırmışlardır. Böbrek nakli sonrası ratlara 150 gün süreyle oral hidrojenden zengin su vermişler ve hidrojenin greft ömrünü uzattığını belirterek böbrek nakli sonrası kullanılabileceğini belirtmişlerdir (27). Katakura ve arkadaşları ise diyabete bağlı gelişen nefropati de hidrojenden zengin su kullanılarak yaptıkları çalışmalarında hidrojenin doku koruyucu etkisini bulmuşlardır. Katakura'ya göre metabolik sendrom ve tip 2 diyabete bağlı gelişen nefropatide hidrojenin tedavi edici özelliği vardır (28).

Xu ve arkadaşları tek taraflı tam üreter obstruksiyonu uyguladıkları ratlara 10 gün süreyle hidrojen vermişler ve hidrojenin böbrek dokusu üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında obstruksiyona uğratılan böbrekte hidrojen böbrekteki apoptozisi ve interstisyel fibrozisi azaltmıştır. Obstruksiyona bağlı böbrek hasarında hidrojen doku koruyucu etki yapmıştır (29).

Nakayama ve arkadaşları yaptıkları 2 ayrı çalışmada diyalize giren hastaların diyaliz solüsyonlarına hidrojen eklemiş ve sonuçta hidrojenin serum inflamatuvar belirteçlerini belirgin olarak azalttığını bildirmişlerdir. Hastalarda herhangi bir yan etki izlememişlerdir (30,31).

Liu ve arkadaşları ratlarda sepsise bağlı akut böbrek yetmezliği oluşturmuşlar ve hidrojen gazı vererek böbrek fonksiyonlarını araştırmışlardır (32). % 2 hidrojen gazı vererek yaptıkları bu deneysel çalışmada hidrojenin serum kreatinin, üre ve inflamatuvar belirteçlerin düzeyinde belirgin bir azalma yaparak sepsiste organ koruyucu etki yaptığını göstermişlerdir. Xie ve arkadaşları ise sepsis modelinde hidrojen gazıyla birlikte hiperoksi sağladıkları ratlarda hidrojen gazının etkisini araştırmışlardır (33). Hidrojen gazı alan ratların serum ve dokularında proinflamatuvar sitokinler ve oksidatif stres ürünlerinin azaldığı;

anti-inflamatuar sitokinlerin ve antioksidan enzim sisteminin aktivitesinin arttığını bulmuşlardır.

Bir anti-kanserojen ilaç olan cisplatin nedeniyle gelişen nefrotoksisite sık karşılaşılan bir klinik durumdur. Hidrojenin cisplatin nefrotoksisitesine karşı etkilerini araştıran deneysel çalışmalarda, hidrojenin biyokimyasal ve radyolojik olarak böbrek dokusunu cisplatine karşı koruduğu bulunmuştur (18,34,35). Hidrojen kullanımı cisplatin alan hastaların böbreklerini koruyarak hastaların hayat kalitesini artırmaya yardımcı olabilir.

Mesane

Matsumoto ve arkadaşları interstisyel sistit / ağrılı mesane sendromu olan hastalara oral yolla hidrojenden zengin su vermişler ve hidrojenin etkilerini araştırmışlardır (36). Plasebo grubuyla hidrojen grubu arasında istatistiksel olarak bir fark izlenmemiştir. Ancak hidrojenden zengin su alan hastaların % 11' inde mesane ağrı skorlarında düzelme izlenmiştir.

Penis

Chen ve arkadaşları diyabete bağlı erektil disfonksiyonu olan ratlara 8 hafta süreyle hidrojenden zengin su vermişler ve sonuçta hidrojenin dokuda ki OH^- radikali ile peroksinitrit düzeylerini azaltarak erektil disfonksiyonu engellediğini ileri sürmüşlerdir (37). Fan ve arkadaşları ise diabete bağlı erektil disfonksiyon modeli oluşturulan ratlara intragastrik olarak hidrojenden zengin sıvı vermişlerdir (38). Çalışmalarında hidrojen tedavisi sonrası ratlarda maksimum intrakavernözal basıncın ve nitrik oksit sentaz aktivitesinin arttığı; penil apopitozisin azaldığı ve diyabetik erektil disfonksiyonun iyileştiği görülmüştür.

Testis

Chuai ve Jiang ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarında ratların testislerine radyasyon vererek testiküler hasar oluşturmuşlar ve hidrojenin bu hasar üzerine etkisini araştırmışlardır (39,40). Chuai çalışmasında hidrojenin hidrok-sil iyonunu azaltarak germ hücreleri koruduğunu, canlı spermatozoa sayısını, günlük sperm üretimini ve sperm kalitesini artırdığını bulmuştur (39). Jiang ise hidrojenin dokuyu apopitozisten koruduğunu ve testosteron seviyesini arttırdığını belirtmiştir (40).

Li çalışmasında ratlara nikotin vererek oksidatif stres oluşturmuş ve hidrojenden zengin suyun etkisini araştırmıştır (41). Hidrojen oksidatif stres belirteçlerini azal-



Şekil 3. Hidrojen gazının patlamasıyla oluşan Hindenburg Zeplin'i faciası

tarak hücreyi korumuş ve erkek üreme fonksiyonlarını iyileştirmiştir.

Jiang ratlarda testis torsiyonu oluşturduğu deneysel çalışmasında hidrojenin testis torsiyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır (42). Hidrojenden zengin sıvı verdiği ratlarda hidrojenin testisteki iskemi-reperfüzyon hasarını engelleyerek testis dokusunu koruduğunu bulmu

Gelecek

Günümüzde hidrojenin antioksidan özelliğinin belirlenmesi açısından çok fazla mesafe kat edilmiş ve deneysel hayvan modellerinde doku koruyucu özelliği kanıtlanmıştır. Şu an için insanlar üzerinde ki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Yenilikçi bir tedavi olarak hidrojenin kliniğe girmesi için çok sayıda insan merkezli çalışma gereklidir.

Klinik olarak etkili sonuçlar alabilmek için hidrojenin vücutta ki fizyolojik etkileri, antioksidan ve farmakolojik özellikleri tam olarak açıklanmalıdır. Gelecekteki çalışmalar hidrojenin fizyolojik ve farmakolojik etkilerini aydınlatmaya yönelik olmalıdır. Tedavi amaçlı kullanım yolu, kullanım şekli, kullanım dozu, doz süresi ve yan etkileri belirlenmelidir. Ayrıca tedavi amaçlı verilecek hidrojen vücutta birikecektir. Mevcut deneysel çalışmalar biriken hidrojenin önemsiz olduğunu belirtse de vücutta biriken hidrojenin olası etkileri iyi araştırılması gereklidir.

Hidrojenin en korkulan özelliği patlayıcı bir madde olmasıdır. Hidrojenin terapötik amaçlı depolama ve taşı-

ma aşaması araştırılmalıdır ve güvenli yöntemler belirlenerek bu konuda evrensel bir standardizasyon getirilmelidir.

Farmakolojik ve fizyolojik etkileri tam olarak belirlenmesi de hidrojen diğer antioksidan ilaçlardan farklıdır. Önleyici ve tedavi edici tıbbi hizmetler için büyük bir potansiyele sahiptir. Oldukça geniş bir hastalık grubunda kullanılabilmesi ve deneysel hayvan modellerinde etkinliğinin çok yüksek olması nedeniyle günümüzde yenilikçi tedavide önemli bir ilaç olarak durmaktadır.

Sonuç

Hidrojen; pek çok ürolojik hastalık modelinde deneysel olarak kullanılmış ve hepsinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Hidrojen kolay bulunması, basit uygulanması, ucuz olması, farklı mekanizmalarla doku koruyucu etki yapması ve hepsinden önemlisi deneysel hayvan modellerinde mükemmel sonuçlar alınması nedeniyle artık hidrojenle ilgili insan odaklı araştırmalar gereklidir. Yapılan çalışmalardan yola çıkılarak üroloji pratiğinde parsiyel nefrektomi, böbrek nakli, böbrek vasküler cerrahileri, testis cerrahileri gibi cerrahi işlemlerde; akut böbrek yetmezliği, diyaliz, obstrüktif üropati, ilaca bağlı nefrotoksite, allograft nefropatisi, sepsis, testis torsiyonu ve erektil disfonksiyon gibi klinik durumlarda, hidrojen kullanılarak dokular korunabilir ve iyileşme süreci kısaltılabilir. Yeryüzünün hayat kaynağı güneşin enerji kaynağı olan hidrojen gelecekte insan sağlığı açısından hayat kurtarıcı bir kaynak olabilir. Bunun için insanlar üzerinde yapılan terapötik amaçlı daha çok ve daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Gardès-Albert M. Physico-chemical aspects of reactive oxygen species. *Ann Pharm Fr* 2006;64(6):365-72.
2. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* 2003;278(5):3170-5.
3. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47(4):333-43.
4. Barbouti A, Doulias PT, Nouis L, Tenopoulou M, Galaris D. DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radic Biol Med* 2002;33(5):691-702.
5. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic

- oxygen radicals. *Nat Med* 2007;13:688-694.
6. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 2008;8:2015-2024.
7. Dixon BJ, Tang J, Zhang JH. The evolution of molecular hydrogen: a noteworthy potential therapy with clinical significance. *Med Gas Res* 2013;3(1):10-15.
8. Levitt MD, Bond JH. Volume, composition, and source of intestinal gas. *Gastroenterology* 1970;59:921 - 929.
9. Nakao A, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR. Therapeutic antioxidant medical gas. *J Clin Biochem Nutr* 2009;44:1-13.
10. George JF, Agarwal A. Hydrogen: another gas with therapeutic potential. *Kidney Int* 2010;77:85 - 87.
11. Qian L, Cao F, Cui J, et al. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice. *Free Radical Research* 2010;44(3):275-282.
12. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 2008;28:137-143.
13. Xie K, Yu Y, Zhang Z, et al. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. *Shock* 2010;34(5):495-501.
14. Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu W, Liu Y, Zhang JH, Denoble PJ, Tao H, Sun X. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med* 2009;234:1212 - 1219.
15. Chen XL, Zhang Q, Zhao R, Medford RM. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:1001 - 1007.
16. Mao YF, Zheng XF, Cai JM, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381:602 - 605.
17. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic gas: Initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther* 2014;144(1):1-11.
18. 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* 2009; 64: 753 - 761.
19. Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, Nakajima M, Miwa N. Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol Ind Health* 2010; 26: 203-216.
20. 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.
21. Tsompos C, Paoulis C, Toutouzas K, Zografos G, Papalois A. The Effect of Erythropoietin on Sodium During Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *J Clin Anal Med* 2014; DOI:10.4328/JCAM.2282
 22. Wang F, Yu G, Liu SY, Li JB, Wang JF, Bo LL, Qian LR, Sun XJ, Deng XM. Hydrogen-rich saline protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2011;167(2):339-44.
 23. Zhu WJ, Nakayama M, Mori T, et al. Intake of water with high levels of dissolved hydrogen (H₂) suppresses ischemia-induced cardio-renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(7):2112-8.
 24. Akdeniz E, Bostancı Y, Özden E, Can BM, Yılmaz AF, Sarıkaya Ş, Yakupoğlu YK. Inhaled Hydrogen Gas Therapy for Prevention of Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Model. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2013;33(4)1097-1102.
 25. Abe T, Li XK, Yazawa K, et al. Hydrogen-rich University of Wisconsin solution attenuates renal cold ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2012;94(1):14-21.
 26. Gu H, Yang M, Zhao X, et al. Pretreatment with hydrogen-rich saline reduces the damage caused by glycerol-induced rhabdomyolysis and acute kidney injury in rats. *J Surg Res* 2014;188(1):243-9.
 27. Cardinal JS, Zhan J, Wang Y, et al. Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 2010;77(2):101-9.
 28. Katakura M, Hashimoto M, Tanabe Y, Shido O. Hydrogen-rich water inhibits glucose and α,β -dicarbonyl compound-induced reactive oxygen species production in the SHR Cg-Leprcp/NDmcr rat kidney. *Med Gas Res* 2012;9(1):18-24.
 29. Xu B, Zhang YB, Li ZZ, et al. Hydrogen-rich saline ameliorates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction in rats. *Int Immunopharmacol* 2013;17(2):447-52.
 30. Nakayama M, Kabayama S, Nakano H, et al. Biological effects of electrolyzed water in hemodialysis. *Nephron Clin Pract* 2009;112(1):9-15.
 31. Nakayama M, Nakano H, Hamada H, et al. A novel bioactive haemodialysis system using dissolved dihydrogen (H₂) produced by water electrolysis: a clinical trial. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25: 3026–3033.
 32. Liu W, Dong XS, Sun YQ, Liu Z. A novel fluid resuscitation protocol: provide more protection on acute kidney injury during septic shock in rats. *Int J Clin Exp Med* 2014;7(4):919-926.
 33. Xie K, Fu W, Xing W, et al. Combination therapy with molecular hydrogen and hyperoxia in a murine model of polymicrobial sepsis. *Shock* 2012;38(6):656-63.
 34. Kitamora A, Kobayashi S, Matsushita T, Fujinawa H, Murase K. Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *The British Journal of Radiology* 2010;83:509–514.
 35. 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*. 2011 Aug;29(7):503-12.
 36. Matsumoto S, Ueda T, Kakizaki H. Effect of supplementation with hydrogen-rich water in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology* 2013;81(2):226-30.
 37. Chen J, Zhang B, Li M, et al. Hydrogen therapy may be a promising, safe and effective treatment for diabetic erectile dysfunction: a hypothesis. *Alternative Medicine Studies* 2011;1:11-8.
 38. Fan M, Xu X, He X, et al. Protective effects of hydrogen-rich saline against erectile dysfunction in a streptozotocin induced diabetic rat model. *J Urol* 2013;190(1):350-6.
 39. Chuai Y, Gao F, Li B, et al. Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals. *Biochem J* 2012;442(1):49-56.
 40. Jiang Z, Xu B, Yang M, et al. Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013;112(3):186-91.
 41. Li S, Lu D, Zhang Y, Zhang Y. Long-term treatment of hydrogen-rich saline abates testicular oxidative stress induced by nicotine in mice. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(1):109-14.
 42. Jiang D, Wu D, Zhang Y, et al. Protective effects of hydrogen rich saline solution on experimental testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Urol* 2012;187(6):2249-53.