

**Diplomarbeit**

**Modulation der ROS als Anti-Aging Strategie**

eingereicht von

**Valentin Loimayr**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie**

unter der Anleitung von

Ass.-Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> Mag.<sup>a</sup> pharm. Corina Madreiter-Sokolowski, Ph.D.

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 20. Juni 2022*

*Valentin Loimayr eh*

# Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>ii</i>
<i>Glossar</i>	<i>vii</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>ix</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>x</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
<i>Einleitung</i>	<b>1</b>
ROS Produktionsstätten	<b>2</b>
Antioxidative Mechanismen	<b>3</b>
Die Rolle der Mitochondrien in der ROS Homöostase	<b>4</b>
<i>Die Rolle der ROS als Signalmoleküle anhand von physiologischen und pathophysiologischen Beispielen</i>	<b>5</b>
Die Rolle der ROS als Signalmoleküle bei arterieller Hypertonie	<b>7</b>
ROS und Vasodilatation	<b>8</b>
ROS und Apoptose	<b>9</b>
<i>Die Rolle der ROS in alterungs-assoziierten Erkrankungen</i>	<b>10</b>
ROS und kardiovaskuläre Erkrankungen	<b>10</b>
ROS und neurodegenerative Erkrankungen	<b>12</b>
<i>Die Modulierung der ROS Homöostase als Anti-Aging Strategie</i>	<b>13</b>
Beta-Blocker	<b>15</b>
ACE-Inhibitoren/AT1-Rezeptor Antagonisten	<b>24</b>
Statine	<b>29</b>
Thrombozytenaggregationshemmer	<b>35</b>
Orale Antidiabetika - Metformin	<b>39</b>
Vitamine (A, C, E)	<b>44</b>
<i>Diskussion und Fazit</i>	<b>47</b>
<i>Literaturverzeichnis</i>	<b>52</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE:	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ACh:	Acetylcholin
ADP:	Adenosindiphosphat
AGE:	<i>Advanced Glycation</i> Endprodukt
AKT:	Gen für Protein Kinase B
AMPK:	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
AP1:	Aktivator Protein 1
apoE:	Apolipoprotein E
APP:	Amyloid-Precursor-Protein
AT II:	Angiotensin 2
AT1:	Angiotensin 1
ATM:	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BAX:	<i>B-cell lymphoma 2-associated X</i> Protein
BCL2:	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH4:	Tetrahydrobiopterin
BMSC:	<i>Bone marrow stem cells</i>
Ca <sup>2+</sup> :	Kalziumion
CaMKII:	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent Protein Kinase II
cAMP:	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR:	Carvedilol
CAT:	Katalase
cGMP:	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHF:	<i>Chronic Heart Failure</i>
COX1:	Cyclooxygenase 1
COX2:	Cyclooxygenase 2
CYP2C:	Cytochrom P450 2C
DHFR:	Dihydrofolat Reduktase
DNP:	2,4-Dinitrophenol
DRG:	Primär adulte Spinalganglien

d-ROM:	Reaktives-Sauerstoff-Metabolit Derivat
Drp1:	Dynamin-related Protein 1
DUOX1, DUOX2:	Dual Oxidase 1, Dual Oxidase 2
EDH:	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarisation</i>
EDHF	<i>Hyperpolarizing Factor</i>
EGFP-LC3B:	<i>Enhanced-grün-fluoreszierendes Protein - Microtubule-associated Protein 1A/1B-light chain 3B</i>
EGFR:	<i>Epidermal Growth Factor</i> Rezeptor
EMA:	<i>European Medicines Agency</i>
eNOS:	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK1/2:	Extrazelluläre Signal-regulierte Proteinkinase
ET1:	Endothelin 1
FDA:	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FOXO:	<i>Forkhead BoxO</i>
FRAP:	<i>Ferric-reducing Ability of Plasma</i>
GCH 1:	GTP cyclohydrolase 1
GLP 1:	Glucagon-like Peptid 1
GPDH:	Glycerol-3-Posphat Dehydrogenase
GPX:	Glutathion Peroxidase
GRXS:	Glutaredoxine
GSH:	Glutathion
GSSG:	Oxidiertes Glutathion
GTN:	Nitroglycerin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> S:	Hydrogensulfid
HDL:	<i>High density lipoprotein</i>
HIF 1:	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HMG-CoA:	3-Hydroxy-3methyl-Glutarsäure Co-Enzym A
HO-1:	Hämoxygenase 1
hs8- OHdG:	<i>Highly sensitive 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</i>

hsCRP:	<i>High-sensitivity C-reaktives Protein</i>
HUVEC:	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IGF1:	<i>Insulin Growth Faktor 1</i>
IL-18:	Interleukin-18
IL-1 $\beta$ :	Interleukin-1 $\beta$
IL-6:	Interleukin-6
iNOS:	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISOP:	Isoproterenol
K <sup>+</sup> :	Kalium Ion
LDH:	Laktatdehydrogenase
LDL:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAO:	Monoaminoxidase
MAPK:	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MDA:	Malondialdehyd
MMP:	Mitochondriales Membranpotential
MMP-2:	Metalloproteinase-2
MMP-9:	Metalloproteinase-9
MPO:	Myeloperoxidase
MPT:	Mitochondriale Permeabilitäts-Transition
mPTP:	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitionsproten
mtDNA:	Mitochondriale Desoxyribonucleinsäure
mTOR:	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC1:	<i>Mammalian Target of Rapamycin Komplex 1</i>
MTT-Assay:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assay
N2a/Swe.D9:	Neuro2a/Presenilin-Exon9-Deletionsmutante
N2a:	Neuro2a
NAD:	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH:	Nicotinamid-Adenin-Dinucleoid-Phosphat
NASH:	Nicht alkoholische Steatohepatitis
NE:	Norepinephrin

NF- $\kappa$ B:	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLRP3:	<i>Nucleotide-binding, leucine-rich repeat containing proteins family pyrin domain containing 3</i>
NO:	Stickstoffmonoxid
NOX:	Nicotinamid-Adenin-Dinukleoid-Phosphat Oxidase
NR4A1/Nur77:	Nuclear orphan receptor 4a1 Nur77
NRF2:	Nuclear Factor-Like 2
O <sub>2</sub> :	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Superoxid
OONO-:	Oxide-Related-Species-Peroxynitrid
oxHDL:	Oxidiertes HDL
oxLDL:	Oxidiertes LDL
PAI-1:	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
p-AKT:	Phospho-AKT
PARP1:	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PDGF:	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> Rezeptor
PDH:	Pyruvat-Dehydrogenase
p-eNOS:	Phospho-eNOS
PGI <sub>2</sub> :	Prostacyclin
PHGS:	Prostaglandin-H <sub>2</sub> -Synthase
PI3:	Phosphatidylinositol 3
PI3K/Akt:	Phosphoinositol-3-Kinase/Akt
PIP <sub>3</sub> :	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKC:	Proteinkinase C
PKC- $\beta$ 2:	$\beta$ 2 Isoform der Proteinkinase C
p-NF- $\kappa$ B:	Phospho-NF- $\kappa$ B
PPAR $\gamma$ :	Transkriptionsfaktor Peroxisom-Proliferatoraktivierter-Rezeptor- $\gamma$
PRDX:	Reduzierte Peroxiredoxine
P-SH:	Protein-Thiol Gruppen
PTPs:	Protein Tyrosin Phosphatasen

PTX3:	Pentraxin 3
RAAS:	Angiotensin-Aldosteron Systems
Rac-1:	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RNA:	Ribonukleinsäure
ROCK:	Rho-assoziierte Protein Kinase
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
RTKs:	Rezeptor Tyrosin Kinasen
RyR2:	Ryanidin Rezeptor 2
SAPK/JNK:	Stress-aktivierte Proteinkinase/Jun N-Terminal Kinase
Scr:	<i>Sarcoma</i>
SIN-1:	<i>3-Morpholinosydnonimine</i>
siRNA:	<i>Small interfering RNA</i>
SIRT1:	Sirtuin-1
SKN-1:	<i>Skinhead-1</i>
SOD:	Superoxid Dismutase
sVCAM-1:	<i>Soluble Vascular Adhesion Molekül 1</i>
TBARS:	Thiobarbitursäure Reaktiven Substanzen
TNF- $\alpha$ :	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
t-PA:	<i>Tissue Type Plasminogen Aktivator</i>
TRX:	Thioredoxin
TRXS:	Thioredoxine
TUNEL:	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
ULK1:	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF:	Von Willebrand Faktor
$\alpha$ 1-AR:	<i>Alpha-1-adrenergic</i> Rezeptor
$\alpha$ -KGDH:	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase

## Glossar

<i>Caenorhabditis elegans</i> :	Fadenwurm, dient als Modellorganismus.
Cytochrom C Peroxidase:	Enzym, der Atmungskette, welches Wasserstoffperoxid zu H <sub>2</sub> O reduzieren kann.
<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Faktor</i> :	Substanz, welche glatte Muskelzellen der Gefäße hyperpolarisiert, dies führt zur Relaxation der Muskelzellen und zur Vasodilatation.
Geroprotektor:	Therapeutische Substanz, welche darauf abzielt, Ursachen des Alterns zu beeinflussen und die Lebensspanne zu verlängern.
Komplex I:	NADH: Ubichinon–Oxidoreduktase, Teil der Atmungskette, reduziert Ubichinon zu Ubihydrochinon.
Komplex III:	Cytochrom-C-Reduktase, Teil der Atmungskette, oxidiert Ubichinon und reduziert Cytochrom C.
<i>Mitochondrial Turnover</i> :	Zyklen der Spaltung und Fusion, welchen Mitochondrien unterliegen.
<i>Mitohormesis</i> :	Biochemische Antwort auf geringen mitochondrialen oxidativen Stress, welche zur Aktivierung der zelleigenen Abwehr gegen Sauerstoffradikale führt.
Mitophagie:	Autophagozytose, mit selektivem Abbau beschädigter Mitochondrien.
Paraquat:	Ammoniumverbindung, kann Superoxidproduktion in Mitochondrien und Zellen stimulieren.

*Second Messenger:*

Substanz, welche von extrazellulär kommende Signale intrazellulär weiterleitet.

Senolytikum:

Molekül, welches die Apoptose von gealterten (seneszenten) Zellen induzieren.

# Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 1: Schematische Darstellung der ROS Produktionsstätten und Abbaumechanismen ..... 4*

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Übersicht Beta-Blocker</i> .....	23
<i>Tabelle 2: Übersicht ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor Blocker</i> .....	29
<i>Tabelle 3: Übersicht Statine</i> .....	34
<i>Tabelle 4: Übersicht Thrombozytenaggregationshemmer</i> .....	38
<i>Tabelle 5: Übersicht orale Antidiabetika</i> .....	43

## Zusammenfassung

In einem Zeitalter, in welchem das Durchschnittsalter der westlichen Bevölkerung stetig zunimmt, gewinnen Anti-Aging Strategien zunehmend an Bedeutung. Hauptverantwortlich für das Altern und den damit verbundenen Komorbiditäten wurden seit Begründung der „Free Radical Theory of Aging“ in den 1950er Jahren vermehrt anfallende reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) gemacht. Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurden in der Vergangenheit unzählige Studien mit antioxidativen Substanzen durchgeführt, um Sauerstoffradikale aus dem Organismus zu eliminieren. Die Ergebnisse der Studien erwiesen sich jedoch größtenteils als Enttäuschung und der erhoffte Erfolg, lebensverlängernde Wirkungen zu erzielen, blieb aus. Mit zunehmend neuen Erkenntnissen zur physiologischen Rolle endogener ROS als Signalmoleküle in der Grundlagenforschung geriet die Anti-Aging Theorie, basierend auf einer vollständigen Eradikation aller Sauerstoffradikale, ins Wanken. Es wurde festgestellt, dass endogene ROS in geringen Mengen nützliche Eigenschaften besitzen, welche ein gesundes Altern sogar eher fördern als verhindern. In dieser Arbeit soll ein Überblick über ROS-modulierende Wirkstoffe gegeben werden, welche potenziell Einfluss auf das Altern nehmen können, mit dem Ziel, Schlüsselmechanismen für zukünftige Therapien zu identifizieren. Die Arbeit beschränkt sich dabei auf bereits etablierte und sichere Wirkstoffgruppen, wie Beta-Blocker, ACE-Inhibitoren, AT-1 Rezeptor Blocker, Statine, Thrombozytenaggregationshemmer und orale Antidiabetika. Vor allem Effekte im Zusammenhang mit kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, welche einen Großteil der Multimorbidität im Alter ausmachen, werden anhand von Vertretern dieser Wirkstoffgruppen näher beleuchtet. Zudem werden noch aktuelle Erkenntnisse zu den antioxidativen Vitaminen A, C und E erwähnt. Für den Einsatz der Wirkstoffe im Sinne einer Primärprävention gibt noch es zu wenig klinische Evidenz. Vorklinische Studien und klinische Studien geben jedoch Hinweise auf die ROS-Modulation als günstige Strategie für die Sekundär- und Tertiärprävention altersassoziierter, degenerativer Gewebeveränderungen.

## **Abstract**

In a time with an average age of the western population continuously rising, anti-aging strategies are gaining importance. Since the development of the “free radical theory of aging” in the 1950’s, reactive oxygen species (ROS) have been assigned as the main cause of aging and all the comorbidities that come with it. Based on this understanding, multiple studies about antioxidants have been conducted to eliminate ROS within the organism. However, for the main part, these studies resulted in disappointment and did not lead to the expected success of longevity. With an increasing knowledge about the physiological role of endogenous ROS as signal molecules, the anti-aging theory, which was based on the complete eradication of all oxygen radicals, began to be questioned. It turned out that endogenous ROS at low levels have useful function that support healthy aging rather than preventing it. This thesis should provide an overview of the ROS-modulating properties of approved drugs and supplements and underlying mechanisms that might be utilized to develop novel anti-aging strategies in the future. The overview is limited to well-established and safe active substance groups such as beta-blockers, ACE-inhibitors, angiotensin-1 receptor blockers, statins, platelet aggregation inhibitors and oral antidiabetics. Especially, effects of compounds used in the treatment of cardiovascular and neurodegenerative diseases, which combine a great deal of causes for multimorbidity in old age, are being analyzed closely. Additionally, recent findings concerning antioxidant vitamins A, C and E are mentioned. Until now, there is not enough clinical evidence to recommend any of these substances for the use of primary prevention. Nevertheless, multiple preclinical and clinical trials are suggesting ROS-modulation as a beneficial strategy for secondary and tertiary prevention of age-associated, degenerative alterations of tissue.

## Einleitung

Das Altern der Bevölkerung in Kombination mit chronischen Erkrankungen wie kardiovaskulären, neurodegenerativen, tumorbedingten oder metabolischen Syndromen gewinnt in Industrieländern zunehmend an Bedeutung (1). Im Zusammenhang mit dem Altern und vielen degenerativen Erkrankungen stehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Insbesondere mitochondriale ROS nehmen dabei einen zentralen Stellenwert ein (2-4). Es ist hinlänglich bekannt, dass hohe ROS Spiegel Zellschädigungen bewirken können. Die klassische „Free Radical Theory of Aging“ suggeriert, dass ROS einen nachteiligen Effekt auf das Altern von biologischen Organismen haben (5). Sinn und Zweck von ROS-eliminierenden Mechanismen wäre demnach ein möglichst effizienter Abbau der Radikale. Dass eine komplette Elimination von Sauerstoffradikalen nicht *per se* wünschenswert ist, zeigt beispielsweise die Funktion von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in der Atmungskette. So wird Wasserstoffperoxid nicht nur über die Cytochrom C Peroxidase entfernt, sondern auch gleichzeitig als Elektronenakzeptor genutzt (6). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ROS in geringen Dosen eine Verbesserung der systemischen Verteidigungsmechanismen über die Induktion einer adaptiven Antwort auslösen können. Dadurch wird vermehrt eine endogene antioxidative Abwehr gebildet, welche eine chronische Schädigung durch oxidativen Stress vorbeugen kann (7-9). Diese Erkenntnis stützt sich unter anderem auf Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), in welchem beispielsweise eine milde Hemmung der mitochondrialen Atmung zu einer vermehrten mitochondrialen ROS Produktion führt und gleichzeitig eine signifikante Erhöhung der Lebensspanne über ROS-medierte Aktivierung der antioxidativen körpereigenen Abwehr stattfindet (10). Des Weiteren bewirkte die Stimulation von *C. elegans* mittels 0.1 mM Paraquat und die damit verbundene Erhöhung der Superoxidkonzentration eine Hochregulierung der Peroxid-eliminierenden Mechanismen, welche wiederum in einem längeren Überleben der Würmer resultierte. Dieser Effekt wurde dosisabhängig beobachtet, eine zu hohe Superoxidkonzentration wirkt sich toxisch aus und verringert die Lebensspanne der *C. elegans*. Die maximale Überlebenszeit ist also mit einer optimalen Konzentration von Superoxiden ( $O_2^-$ ) vergesellschaftet (11). Der Effekt, dass Einflussfaktoren dosisabhängig zu einer bestimmten Wirkung führen, wird als Hormesis bezeichnet (8, 12-14). Im Falle einer mitochondrialen Hormesis, der sogenannten „*Mitohormesis*“, können ROS-abhängige Abwehrmechanismen über verschiedene Faktoren, wie Nahrungskarenz, Hypoxie, temperaturbedingten Stress, Sport oder Signalkettenmoleküle, wie den *Insulin-like growth*

*factor 1* (IGF1) Rezeptoren oder der Adenosinmonophosphat-abhängigen Kinase (AMPK) moduliert werden (15-19). Natürliche und pharmakologische Komponenten, wie Antioxidantien haben ebenfalls einen modulierenden Effekt auf ROS Signale (20). Obwohl in der Literatur die Akkumulation von ROS als eine der primär treibenden Kräfte zur Zellschädigung als auch für eine verkürzte Lebensspanne beschrieben wird, konnte bei mehrfachen Untersuchungen mit antioxidativer Manipulation kein Einfluss auf die Gesamtüberlebensdauer gefunden werden (7, 21-23). Als Signalmoleküle haben ROS zudem Einfluss auf die Zelldifferenzierung, die Geweberegeneration sowie das Altern (24, 25).

Es gilt nun zu untersuchen, welche bereits durch die European Medicines Agency (EMA) oder die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Wirkstoffe eine Modulation der ROS Levels und damit womöglich eine *mitohormetische* Anpassung im Menschen hervorrufen können. Zudem soll diskutiert werden in welchen Dosierungen eine Supplementation von Antioxidantien in gewissen Lebensphasen sinnvoll sein kann.

Eine ideale antioxidative Therapie könnte ein pathologisches Ausmaß an ROS-Akkumulation verhindern, ohne mit den ROS selbst in ihrer Funktion als Signalmoleküle zu interferieren (7). Neue Therapien mit ROS-modulierender Wirkung sollten auf diese Weise zukünftig altersassoziierte Pathologien verhindern oder positiv beeinflussen. Folglich werden in dieser Arbeit die Mechanismen der ROS in physiologischen so wie pathophysiologischen Zuständen als auch Wirkungen von antioxidativ wirksamen Medikamenten wie Beta-Blockern, ACE-Inhibitoren, Angiotensin-1 Rezeptor Antagonisten (ARB), Statinen und Thrombozytenaggregationshemmern untersucht und bewertet. Zusätzlich werden aktuelle Erkenntnisse zu antioxidativen Eigenschaften von Supplementen, wie Carotinoiden (Vitamin A), Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C) kurz beleuchtet.

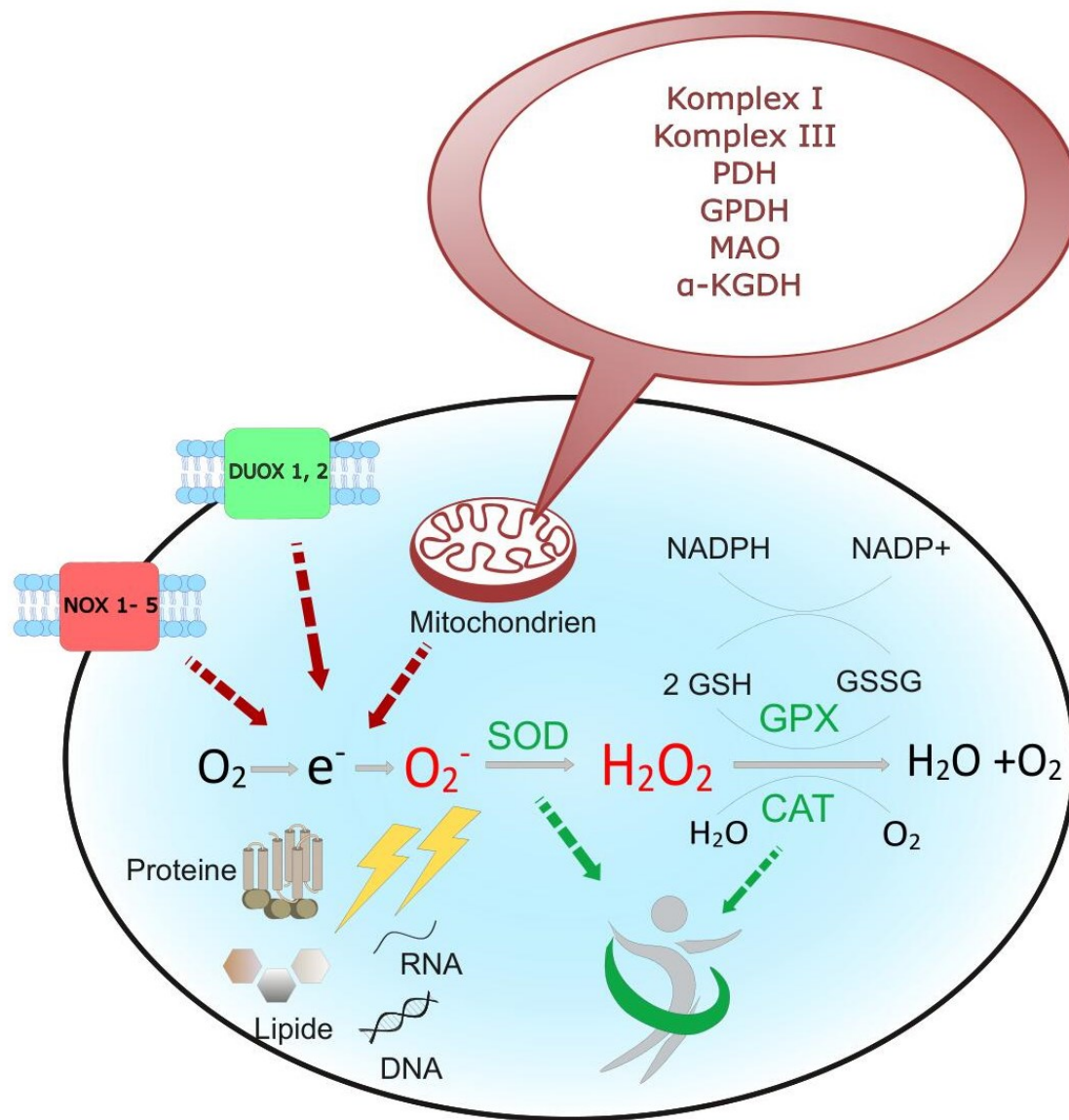
## **ROS Produktionsstätten**

Um ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen der ROS Modulation zu bekommen, ist es sinnvoll, die ROS Produktionsstätten sowie die Regulation dieser zu kennen. Die wichtigsten Produktionsstätten für ROS befinden sich in den Mitochondrien. Zu den mitochondrialen ROS-Produktionsorten zählen vor allem der Komplex I und der Komplex III der Atmungskette, die Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (GPDH), die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase ( $\alpha$ -KGDH) sowie die

Monoaminoxidase (MAO) (26-29). Der Komplex III und die GPDH besitzen die Fähigkeit, Superoxide sowohl in der Mitochondrienmatrix als auch im mitochondrialen Intermembranraum, also zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran, zu generieren. Alle anderen mitochondrialen Produktionsstätten produzieren ROS ausschließlich in der Matrix der Mitochondrien (30). Zu den Produktionsstätten außerhalb der Mitochondrien zählt die membrangebundene Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase (NOX), welche unter anderem im Rahmen der zellulären Abwehr Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen produziert (31). Die NADPH Oxidasen können je nach Lokalisation in NOX1-5 unterteilt werden (32), zusätzlich existieren im Zytosol noch die dualen Oxidasen 1 und 2 (DUOX1, DUOX2) und weitere Enzyme, welche einen geringeren Anteil an der zellulären ROS Produktion einnehmen (33).

### **Antioxidative Mechanismen**

Der Abbau von ROS geschieht über Superoxiddismutasen (SODs), Katalasen, Glutathionperoxidasen und Glutathionreduktasen (34, 35). Die antioxidativen Mechanismen befinden sich im Körper an verschiedenen Lokalisationen. Dazu zählen klassischerweise Peroxisome (Katalase), verschiedenen Organellen insbesondere Mitochondrien (SOD, Glutathionperoxidase) sowie das Zytosol (SOD, Glutathionperoxidase, Aminosäuren, Peroxiredoxine) (36). Einige Enzyme können an mehreren dieser genannten Lokalisationen wirken, beispielsweise unterscheidet man zwischen einer zytosolischen Superoxiddismutase 1 (SOD1 bzw. CuZnSOD), einer mitochondrialen Superoxiddismutase (SOD2 bzw. MnSOD) und der Superoxiddismutase 3 (SOD3 bzw. EC-SOD), welche sich an der Plasmamembran befindet (32, 37). Alle Superoxiddismutasen katalysieren die rasche Umwandlung von Superoxiden zu Wasserstoffperoxid. Dadurch wird die Toxizität von ROS limitiert und gleichzeitig ihre Funktion als Signalmoleküle reguliert (38). Wasserstoffperoxid wiederum wird von Katalasen (CAT) zu Wasser und Sauerstoff oder über die Glutathionperoxidase (GPX) zu Wasser und oxidiertem Glutathion umgewandelt. Ebenso katalysieren reduzierte Peroxiredoxine (PRDX) die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Zeitgleich werden sie durch Thioredoxin (TRX) oxidiert und dadurch in ihrer katalytischen Aktivität wiederhergestellt (28, 39). Die wichtigsten Mechanismen sind in der Abbildung 1: Schematische Darstellung der ROS Produktionsstätten und Abbaumechanismen nochmals veranschaulicht.



Legende:  
 PDH: Pyruvatdehydrogenase, GPDH: Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase, MAO: Monoaminoxidase, α-KGDH: α-Ketoglutaratdehydrogenase, NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, NADP+: oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathion-Disulfid

Abbildung 1: Schematische Darstellung der ROS Produktionsstätten und Abbaumechanismen

## **Die Rolle der Mitochondrien in der ROS Homöostase**

Proinflammatorische Prozesse chronisch degenerativer Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose, können mit erhöhter ROS Freisetzung im Zuge mitochondrialer Störungen assoziiert sein (40). Zusätzlich zu einer erhöhten ROS Produktion geschädigter Mitochondrien kann auch die Freisetzung der mitochondrialen DNA (mtDNA), welche dann als damage-assoziiertes molekulares Muster (DAMP) fungiert, Entzündungsreaktionen auslösen (41). Unter Normalbedingungen gelingt es den Mitochondrien exzessiven oxidativen Stress über antioxidative und Reparatursysteme auszugleichen. Über den Mechanismus des „*Mitochondrial Turnovers*“ kann sogar beschädigte mitochondriale DNA (mtDNA) wiederverwertet werden. Dabei werden geschädigte Anteile von Mitochondrien, wie eben die mtDNA, zu kleineren Strukturen fragmentiert und später über die Mitophagie, eine Art der Autophagie, wiederverwertet (42, 43). Störungen der Mitophagie und geschädigte mitochondriale Organellen können zu gefährlich hohen Anstiegen von ROS Levels führen (44). Eine funktionierende Mitophagie hingegen kann sehr effizient die *NLR family pyrin domain containing 3* (NLRP3) Inflammasom Aktivierung hemmen und diesen ROS Anstieg verhindern. Eine Überaktivierung des NLRP3 Inflammasoms, durch eine gestörte mitochondriale Homöostase und ROS Produktion kann wiederum zu pathologischen Prozessen bis hin zu neurologischen Funktionsstörungen führen (45-47). Aber nicht nur neurologische Funktionsstörungen präsentieren sich als Folge mitochondrialer Dysfunktion. Dysfunktionale Mitochondrien in Low Density Lipoprotein (LDL) phagozytierenden Zellen tragen über proinflammatorische Prozesse, unter anderem durch ROS Freisetzung, zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques bei (48) und sind mit beschleunigtem Altern assoziiert (49-52). Therapeutische Ansätze zur Gewährleistung einer intakten mitochondrialen Funktion erscheinen daher vielversprechend (43).

## **Die Rolle der ROS als Signalmoleküle anhand von physiologischen und pathophysiologischen Beispielen**

Reaktive Sauerstoffspezies können in verschiedenen Organismen als Signalmoleküle wirken (34, 53, 54). ROS in der Funktion als Signalmoleküle konnten im Zusammenhang mit der Apoptose, der Autophagie, Zelldifferenzierung, Stress des endoplasmatischen Retikulums, der antioxidativen Abwehr, der Hypoxie und der angeborenen Immunabwehr festgestellt werden (55-67). Die Mindestanforderungen, die ein Molekül erfüllen muss, um als Signalmolekül zu gelten sind laut *Bartosz et al.* (37) die Kontrolle der Molekülkonzentration

hinsichtlich Synthese und Elimination, die Existenz von Rezeptoren für das Molekül und die Reversibilität der Signalwirkung. Die besten Kandidaten unter den ROS, welche diese Voraussetzungen erfüllen, sind Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen. Beide werden durch Enzyme gebildet (z.B. NOX) und ihre Konzentrationen werden streng über Enzyme reguliert (z.B. SOD), womit Punkt 1 der Kriterien für Signalmoleküle erfüllt ist (37). Zu den Hauptzielen von Wasserstoffperoxid zählen Cysteine, die zu Disulfiden oxidiert werden. Die Disulfide können durch Glutaredoxine (GRXS), Thioredoxine (TRXS) oder durch Glutathion (GSH) reduziert werden. Die Wirkung ist also reversibel, somit ist auch Punkt 3 der Kriterien für Signalmoleküle erfüllt (68). Den 2. Punkt der Kriterien, also die Existenz von spezifischen Rezeptoren für ROS zu belegen gestaltet sich etwas schwieriger, da die genauen Mechanismen der ROS als Messengermoleküle teilweise noch unerforscht sind. Tatsache ist jedoch, dass ROS unter anderem auch Proteine oxidieren und somit auch Änderungen in der Ladung, Größe, Hydrophobie und Polarität einzelner Aminosäuren herbeiführen können (37). Dies spielt beim Ablauf zahlreicher Signalwege eine wesentliche Rolle. Ziele für die sogenannte „Redox Regulation“ sind verschiedene Phosphatasen, Kinasen und Faktoren. Dazu zählen die Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs) (68-70) und die Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs), darunter der *Platelet-derived Growth Factor* Rezeptor (PDGF), der *Epidermal Growth Factor* Rezeptor (EGFR), der *Vascular Endothelial Growth Factor* Rezeptor (VEGF Rezeptor), die Insulin Rezeptor Kinase und der *Fibroblast Growth Factor* Rezeptor (68). Ebenso wie die bereits genannten zählen auch Non-Rezeptor Kinasen zu den Zielen der ROS-medierten Regulation, dazu zählen AKT, die cAMP-dependent Proteinkinase, die Src Family Kinasen, die MAPK, die ATM Protein Kinase, die Inhibitory  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) Kinase, die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) sowie die cGMP-Dependent Protein Kinase (68). Weitere Faktoren, die nicht zu den bereits genannten Gruppen gehören sind die Transkriptionsfaktoren Forkhead BoxO (FOXO) und der Nuclear Factor-Like 2 (NRF2). All diese ROS-abhängigen Signalkaskaden spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung von altersassoziierten Erkrankungen, wie Atherosklerose, Tumorerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen bei (68).

Es gibt viele Studien, in denen die „Second Messenger“ Funktion von ROS untersucht wurde, eine davon erforschte beispielsweise die ROS-abhängige Differenzierung von Adipozyten. In dieser wird über den Mammalian Target of Rapamycin Komplex 1 (mTORC1) der mitochondriale Stoffwechsel angeregt, woraufhin im Komplex III vermehrt ROS gebildet werden. Diese neugebildeten ROS wiederum induzieren, über den

Transkriptionsfaktor Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), die Bildung der zur Adipozyten-Differenzierung benötigten Zellprodukte (71). ROS wirken, wie zuvor beschrieben, in sehr begrenzten Konzentrationsspektren, da sie in zu hohen Dosen durch ihre Reaktivität ein hohes Potential zur Zellschädigung aufweisen. Erwähnenswert ist dazu auch die Kompartiment-abhängige Wirkung der ROS. Während erhöhte zytosolische Superoxidspiegel beispielsweise die Lebensspanne von *C. elegans* verringern, konnte diese durch erhöhte Superoxidkonzentrationen in den Mitochondrien signifikant verlängert werden. Die Autoren sprechen von einem Kompartiment-spezifischen Effekt (72). Die Einflussbereiche von Sauerstoffradikalen sind sehr unterschiedlich. Superoxidanionen reagieren über die Superoxiddismutase zum stabileren und diffusionsfähigeren Wasserstoffperoxid. Superoxidanionen sind zwar insgesamt stark reaktiv, können aber nur über sehr kurze Reichweiten wirken. Das weniger reaktive Wasserstoffperoxid hingegen besitzt einen wesentlich größeren Einflussbereich (73, 74). In Endothelzellen wiederum werden der vaskuläre Tonus, die O<sub>2</sub>-Messung, das Zellwachstum, die Proliferation, die Apoptose und Entzündungsreaktionen über ROS gesteuert (25, 75). ROS sind über die erhöhte VEGF Expression, aber auch VEGF-unabhängig mit der Angiogenese assoziiert (76, 77). Basierend auf der Tatsache vermehrter oxidativer Schäden im Alter, könnte das Altern ein Resultat einer insuffizienten Reaktion auf endogene ROS Signale darstellen (18).

### **Die Rolle der ROS als Signalmoleküle bei arterieller Hypertonie**

Angiotensin II (AT II), Norepinephrin (NE) und Endothelin-1 (ET-1) stimulieren Rezeptoren an der zytoplasmatischen Membran (AT<sub>1</sub>,  $\alpha_1$ -AR und ET-Rezeptoren). Diese Rezeptoren aktivieren über die Bindung an G-Proteine die NOX. Die NOX sind bei Hypertonie die wichtigste ROS Produktionsstätte und produzieren das Superoxidanion. Die neugebildeten Superoxidanionen induzieren anschließend teilweise bereits oben genannte, phosphorylierende Signalwege (Tyrosinkinasen, die Phosphoinositol-3-Kinase/AKT Kinase (PI3K/AKT), die Mitogen-Activated Protein Kinasen (MAPKs) und die Rho-assoziierte Protein Kinase (ROCK)) (78). Durch die Kinasen werden die Transkriptionsfaktoren p53, Aktivator-Protein-1 (AP-1), Nuclear E2-related Faktor 2 (NRF2) und NF- $\kappa$ B phosphoryliert und dementsprechend auch aktiviert. Die Transkriptionsfaktoren leiten im Zellkern die Expression für Proteine ein, welche in Zusammenhang mit Entzündungsprozessen, Hypertrophie, Nekrose und Apoptose stehen und schlussendlich zu endothelialer Dysfunktion und arterieller Hypertension führen (79, 80). Angiotensin II (AT II) aktiviert die Proteinkinase C (PKC) über den AT II Typ 1 Rezeptor. Die Aktivierung der PKC führt

wiederum zu vermehrter ROS Produktion. Die gebildeten ROS stimulieren die zelluläre Tyrosinkinase (Src) und die Src Kinase. Dadurch werden der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) und die Phosphatidylinositol-3 (PI3) Kinase aktiviert, welche für die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) verantwortlich ist. PIP<sub>3</sub> aktiviert indirekt das G-Protein Rac-1, welches die Formation des Enzyms NOX erleichtert (81) und damit die ROS Produktion weiter ankurbelt (82). Eine AT II abhängige ROS Produktion führt als zusätzlicher Mechanismus über die signifikante Reduktion der endothelialen Stickstoff-Synthase (eNOS) Aktivität und Stickstoffmonoxid (NO) Produktion sowie über vermehrte Lipid-Peroxidation in Kombination mit der Induktion von apoptotischen Signalen und der Aktivierung von NF-κB schlussendlich zur endothelialen Dysfunktion und zur vaskulären Entzündung. Die Summe dieser Faktoren begünstigen die Entstehung einer arteriellen Hypertonie (83). Endothelin-1 zählt als potenter Vasokonstriktor. Es können zwei Isoformen von ET-1 Rezeptoren unterschieden werden, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>. Eine ET<sub>A</sub>-Rezeptor Aktivierung verursacht eine G-Protein-vermittelte Aktivierung der NOX. Die daraus resultierende ROS Produktion führt zu einer Vasokonstriktion. Eine Aktivierung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors hingegen führt zu Vasodilatation (78, 84-86). In Kardiomyozyten wird die ROS Produktion über die Stimulation von α<sub>1</sub>-adrenergen Rezeptoren (α<sub>1</sub>-AR) durch Norepinephrin angeregt (86). Dabei stimuliert Norepinephrin die Aktivität der Monoaminoxidase A (MAO-A), einem Enzym, welches vor allem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und führt so zur Produktion von Wasserstoffperoxid. Dies wiederum trägt zum Umbau und zur Hypertrophie im Herzmuskelgewebe bei (87), dies spricht für eine zentrale Regulierung der Sauerstoffradikalproduktion und für eine wichtige Signalwirkung der ROS.

### **ROS und Vasodilatation**

Wasserstoffperoxid kann vasoaktiv wirken. Versuche an Ratten zeigen, dass der koronare Blutfluss positiv mit dem Wasserstoffperoxid-Spiegel korreliert. Auch ein hoher myokardialer Sauerstoffverbrauch wird mit hohen Wasserstoffperoxid-Spiegeln assoziiert. Es liegt also nahe, dass durch erhöhten myokardialen Stoffwechsel die Menge an Wasserstoffperoxid steigt und dadurch eine physiologische Vasodilatation ausgelöst wird (88). Wasserstoffperoxid kann als Endothelium-Derived-Hyperpolarizing Faktor (EDHF) agieren bzw. die Endothelium-Derived Hyperpolarisation (EDH) in Endothelzellen fördern und so zur Relaxation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand (Vasodilatation) beitragen (89-92). Beispielsweise konnte eine Beteiligung von Wasserstoffperoxid an der EDH-

assoziierten Relaxation von Nierenarterien festgestellt werden. Die CYP2C Epoxygenase stellt dabei eine bedeutende Quelle für Wasserstoffperoxid dar (93). In koronaren Arteriolen mediiert Wasserstoffperoxid, gebildet durch Scherspannung, nachweislich die flow-induzierte Dilatation (94, 95). Wasserstoffperoxid kann durch die endotheliale Zellmembran diffundieren und dort  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$  Kanäle aktivieren, was wiederum zu einer Vasodilatation führt (94). Bei *in vivo* Studien mit Ratten wurde der Einfluss von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen auf die Acetylcholin-induzierte (Ach) Vasodilatation beobachtet. Die Studie impliziert eine wesentliche Rolle von ROS als Mediatoren einer endothelabhängigen Vasodilatation in Arteriolen der Skelettmuskulatur (96).

### **ROS und Apoptose**

Die Apoptose ist ein absolut zentraler Bestandteil der Homöostase, fehlgeleitete apoptotische Prozesse enden meist in pathophysiologischen Zuständen, wie Tumorerkrankungen (97), neurodegenerative Erkrankungen (98) sowie kardiovaskulären Erkrankungen (99), weshalb die therapeutische Einflussnahme auf die Apoptose ein hochattraktives Ziel für die Forschung darstellt. Es existieren zwei Formen der Apoptose, welche zwar als unterschiedliche Signalwege beschrieben werden, jedoch miteinander im Zusammenhang stehen. Man unterscheidet einen intrinsischen, mitochondrialen Signalweg und den extrinsischen Signalweg über den sogenannten „Death Cell“ Rezeptor (100). ROS induzieren den Zelltod vor allem über den mitochondrialen Weg, so können ROS beispielsweise indirekt über die Störung der mitochondrialen Membranpermeabilität eine Apoptose in Endothelzellen herbeiführen. Die Membranpermeabilitätsstörung führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmatrix in das Zytosol und dadurch zu einer Aktivierung der Caspase -3. Auf die Aktivierung von Caspase -3 folgt die Apoptose (101, 102). Interessant ist dieser Mechanismus auch in der Onkologie, wo die Apoptose entarteter Zellen gewünscht wird. Hohe ROS Levels können bei Tumorzellen zu Apoptose führen, jedoch können sie auch eine Rolle für die Resistenz der Tumorzellen gegen Chemotherapeutika spielen (103), weshalb sie aktuell auch hier von wichtiger Bedeutung und Gegenstand der Forschung sind (104).

## Die Rolle der ROS in alterungs-assoziierten Erkrankungen

### ROS und kardiovaskuläre Erkrankungen

Oxidativer Stress beeinflusst Entzündungsreaktionen, Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Änderungen des vaskulären Tonus. Damit zählen ROS als wesentliche Faktoren für die Entwicklung der Atherosklerose (105). Durch Verletzung des Endothels kann sich LDL unter der Intima ansammeln, wo es durch Myeloperoxidasen und Lipoxygenasen sowie andere nicht enzymatische Reaktionen zu ox-LDL oxidiert wird (106). Das nun ox-LDL in der Intima bewirkt eine verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs), wie dem Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) oder P- und E-Selektin in den Endothelzellen. Durch die Expression der Adhäsionsmoleküle bleiben vermehrt Leukozyten (Monozyten und T-Zellen) an den verletzten Stellen der Gefäßwand haften und wandern unter dem Einfluss von Monocyte Chemoattractant Proteinen (MCP-1), Eotaxin und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) in die Intima ein (107). Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche sich durch die Phagozytose von modifiziertem LDL schließlich zu den histologisch typischen Schaumzellen verändern. Nicht nur rekrutierte Zellen, wie Makrophagen, sondern auch Zellen der Arterienwand, wie modifizierte glatte Muskelzellen, sind in der Lage modifiziertes LDL aufzunehmen und sich in lipidreiche Schaumzellen zu transformieren (108). Die neugebildeten Schaumzellen exprimieren *Scavenger* Rezeptoren (SRs), wie dem Cluster of Differentiation 36 (CD 36), dem *Scavenger* Receptor A (SR-A) und den Lectin-like ox-LDL Rezeptor-1 (LOX-1) (109). In der Gefäßwand werden nun von T-Lymphozyten, Mastzellen und Schaumzellen Zytokine freigesetzt, die unter anderem die Produktion von ROS fördern. ROS und Wachstumsfaktoren stimulieren wiederum die Migration glatter Muskelzellen und die Kollagenablagerung, was letztendlich zur atherosklerotischen Plaquebildung führt (107).

Allgemein kann man sagen, dass drei ROS-assoziierte Mechanismen im Zusammenhang mit Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen. Sie setzen sich zusammen aus der direkten Zellmembranschädigung und der Schädigung des Nucleus, der Interaktion endogener vasoaktiver Mediatoren in Endothelzellen und aus der Produktion von oxidierten Lipoproteinen, vor allem des oxLDL (110-112). Zu den Hauptproduzenten von ROS in Blutgefäßen zählen die NOX sowie die Xanthinoxidase, Myeloperoxidasen, die entkoppelte endotheliale NO Synthase (eNOS), Lipoxygenasen und mitochondriale Enzyme (112, 113).

In Endothelzellen sind hauptsächlich vier ROS Quellen dominant, die NOX, die Xanthinoxidase, die entkoppelte eNOS und mitochondriale ROS Quellen (75, 114). Die Atherosklerose ist charakterisiert durch Lipid- und Proteinoxidation in den Gefäßwänden, gefördert wird dies durch eine Imbalance oxidativer und antioxidativer Stoffe (115, 116). Die mitochondriale ROS Produktion wird normalerweise streng reguliert. Eine Störung in dieser Regulation durch eine beispielsweise unzureichende Funktion antioxidativer Mechanismen, endet üblicherweise in mitochondrialem oxidativen Stress (117). In der Gefäßwand induzieren die vermehrt anfallenden ROS die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs), die Apoptose von Endothelzellen und eine erhöhte Aktivität der Metalloproteinasen. Dadurch fördern sie in späterem Stadium der Atherosklerose auch die Destabilisierung von Plaques (118). Viele Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit erhöhter ROS Produktion in den Gefäßwänden und vermehrtem oxidativen Stress assoziiert, darunter befinden sich klassischerweise das Altern, das Rauchen, *Diabetes mellitus*, die Hypercholesterinämie und die arterielle Hypertonie (119). Sie fördern die Produktion von freien Sauerstoffradikalen im Endothel und in der Adventitia (105).

Zytokine, wie TNF-  $\alpha$ , fördern während entzündlichen Prozessen die Produktion von ROS. Die anti-atherogene Wirkung der eNOS kann durch ROS beeinträchtigt werden (120). Die vermehrt anfallenden ROS begünstigen atherogene Prozesse durch die Veränderung der Vasomotion, die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen (Remodelling, Plaqueruptur), die Lipidoxidation, die Apoptose von Endothelzellen und durch die Proliferation sowie Migration der vaskulären glatten Muskelzellen (81, 116, 118, 121, 122). Einen weiteren Risikofaktor für Atherosklerose stellt die Hyperhomocysteinämie (HHcy) dar. Die mit HHcy assoziierten atherogenen Effekte, wie die endotheliale Dysfunktion, Entzündungsreaktionen und Proliferation der endothelialen glatten Muskelzellen werden ebenfalls von ROS mediiert (123).

Die Grundmechanismen der Atherosklerose auf zellulärer Ebene sind trotz umfangreicher Forschung nicht restlos verstanden und doch zeichnen sich gewisse ROS-assoziierte Vorgänge ab, die zur Entstehung der vaskulären Funktionsstörung beitragen. Der sogenannte „Phänotypische Switch“ vom kontraktile Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen zu einem dedifferenzierten Phänotyp mit proliferativen und migrationsfreudigen Eigenschaften bildet einen der Grundbausteine für die Entstehung kardiovaskulärer Malfunktion (124). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass ROS maßgeblich an Signalkaskaden betreffend die

Differenzierung, die Proliferation und die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) beteiligt sind. Darüber hinaus gilt oxidativer Stress als zentraler Faktor in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. (125-127). Der Zusammenhang zwischen ROS Produktion und phänotypischen Switch kann durch eine Blockade der ROS Produktion (z.B. mit Rapamycin) sichtbar gemacht werden. Die Inhibierung verhindert die Aktivierung des Platelet-derived Growth Factor BB (PDGF-BB) induzierten ROS/NF- $\kappa$ B/mTOR/P70S6K Signalweges und folglich den phänotypischen Switch, die Proliferation und die Migration von VSMCs (124, 128-130).

Wesentlich im Zusammenhang mit dem Altern und der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen ist auch ein erhöhter Glukosespiegel (131). Intrazellulär führt eine Hyperglykämie zu vermehrter Produktion von Elektronendonatoren, wie NADH und FADH<sub>2</sub> und einer Erhöhung des mitochondrialen Protonengradienten. Infolgedessen fallen in den Mitochondrien vermehrt ROS an (25). Die ROS aktivieren die Poly-(ADP-ribose) Polymerase und inhibieren dadurch gleichzeitig die Aktivität von Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (132). Die verminderte GAPDH Aktivität bewirkt unter anderem eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (133) sowie von NF- $\kappa$ B (25), was schließlich in einer geringeren Expression von anti-atherogenen Enzymen, wie der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) und der Prostacyclin Synthase (PGI<sub>2</sub>-Synthase) resultiert (134). Die Inhibierung von GAPDH induziert auch die Bildung von Advanced Glycation End Products (AGEs) und Vascular Cell Adhesion Protein 1 (VCAM-1), frühe Marker einer Atherosklerose (25, 134, 135). Gleichzeitig werden proinflammatorische Prozesse aktiv und vermehrt Vasokonstriktoren, wie Endothelin-1 gebildet (25).

## **ROS und neurodegenerative Erkrankungen**

Neurodegenerative Erkrankungen sind häufig Ursache für die Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten im Alter. Auslöser dafür sind meist Erkrankungen wie die Alzheimer Demenz, Morbus Parkinson, die frontotemporale Demenz, die kortikobasale Degeneration die progressive supranukleäre Blickparese und die Lewy-Body Demenz (136). Zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion unter physiologischen Bedingungen existiert ein feines Gleichgewicht zwischen freien Sauerstoffradikalen und der antioxidativen Abwehr. Eine Verschiebung des Gleichgewichts auf Seiten der ROS führt zu verstärkter Lipidperoxidation, Fehlfaltung und Ablagerung von Proteinen und DNA-Schäden, was in letzter Instanz zu neurodegenerativen Prozessen, vor allem im stark vulnerablen Gewebe des Gehirns, führen kann (137). Mitochondriale ROS und durch die aktivierte NOX anfallende

ROS tragen zur Aktivierung der Mikroglia bei, sie können als *Second Messenger* in der Mikroglia dauerhaft entzündliche Zustände fördern (138). Die Alzheimer Erkrankung ist Hauptursache für Demenz und entwickelt sich zu einer der größten zukünftigen Belastungen für das Gesundheitswesen in Europa (139). 2018 lebten weltweit ungefähr 50 Millionen Menschen mit Demenz, diese Zahl wird sich nach Schätzungen bis zum Jahr 2050 voraussichtlich verdreifachen (140). Die charakteristischen Kennzeichen in der Histopathologie für die Alzheimer Demenz sind die Bildung von  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) Plaques, welche als Spaltprodukt des Amyloid Vorläuferproteins (APP) anfallen sowie Konglomerate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (141). Auffallend bei der Alzheimer Demenz ist das gehäufte Auftreten oxidativer Schäden neuronaler Lipide und Proteine (142). Die für das Redox -Gleichgewicht essenzielle Homöostase von Metallionen ist bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz ebenfalls häufig gestört, insbesondere Kupfer und Zink Ionenspiegel können stark erhöht sein (143). Kupfer und Eisenionen können in Kombination mit A $\beta$  für das verstärkte Auftreten von ROS verantwortlich sein (144). A $\beta$  und APP sind darüber hinaus in der Lage die Mitochondrienfunktion zu stören und so zu einer vermehrten ROS Produktion beizutragen (145).

## **Die Modulierung der ROS Homöostase als Anti-Aging Strategie**

Eine zu hohe ROS Konzentration steht im unweigerlichen Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, es ist daher naheliegend, diese mit antioxidativen Therapieansätzen zu behandeln (80). In mehreren Studien, die antioxidative Therapien am Menschen untersuchten, ließ sich jedoch kein Effekt oder sogar negative Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf feststellen (23, 146-150). Trotz dieser ernüchternden Erkenntnisse konnten in aktuelleren Metaanalysen positive Effekte antioxidativer Therapien gefunden werden (80, 83). Um diese unterschiedlichen Ergebnisse besser zu verstehen wird der folgende Teil sich am Beispiel der Beta-Blocker, Statine, ACE-Inhibitoren und Thrombozytenaggregationshemmer mit der Analyse von *in vitro*, *in vivo* und klinischen Studien zu ROS-modulierenden Wirkstoffgruppen in Zusammenhang mit altersassoziierten Erkrankungen befassen.

Bisher wurden über 400 Substanzen identifiziert, welche das Leben von 27 verschiedenen Modellorganismen potenziell verlängern können. Gelistet werden diese sogenannten Geroprotektoren in der DrugAge Database (151). Problematisch trotz hoher Anzahl an gefundenen, potenziell lebensverlängernden Komponenten ist jedoch, dass sie häufig

unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen, welche sie für den Einsatz am Menschen unbrauchbar machen. Rapamycin zum Beispiel wies in mehreren Studien lebensverlängernde Effekte an verschiedenen Modelorganismen, wie *C. elegans* (152) und *M. Musculus* (153) sowie eine akzeptable akute Toxizität auf (LD<sub>50</sub> (p.o) bei Mäusen > 2500mg/kg) auf (154). Man konnte positive Effekte auf kardiale, neurodegenerative Syndrome sowie das Auftreten von Neoplasien feststellen (155, 156). Jedoch birgt der Wirkstoff gleichzeitig eine Bandbreite an unerwünschten anderen Wirkungen wie Hyperglykämie, Anämie, Lungentoxizität und Hyperlipidämie (157). Das endgültige Ziel des Identifizierens lebensverlängernder Substanzen ist es, Strategien zu finden, welche das gesunde Altern von Menschen unterstützen und dabei gleichzeitig so wenig gesundheitsschädigende Wirkungen wie möglich aufweisen. Um diese Sicherheit zu gewährleisten, wurden Kriterien festgelegt, welche eine Hilfestellung zur Identifikation von geeigneten Komponenten für den Gebrauch am Menschen bieten. Folglich sollen potenziell verwendbare Substanzen primär die Lebensspanne verlängern, humane Aging-Biomarker verbessern, eine akzeptable Toxizität aufweisen, minimale Nebenwirkungen in therapeutischer Dosis bewirken und die gesundheitsbezogene Lebensqualität verbessern (158). Zusätzlich zur Einhaltung dieser Kriterien stellt sich die Frage, ab welchem Zeitpunkt und in welcher Dosierung es sinnvoll ist diese lebensverlängernden Substanzen einzusetzen. Ein Beispiel dafür ist eine Studie untersucht wurde, ob geringe Dosen an Catechinen und Resveratrol über Mitohormesis als Ansatz für Anti-Aging Therapien in Frage kommen. Dabei wurde gezeigt, dass das Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) die Lebensspanne im Sinne einer *Mitohormesis* über eine umgekehrte U-förmige Dose-Response Wirkungsweise verlängert. Bei Versuchen mit *C. elegans* konnte bei niedrigen Dosierungen von EGCG (50 – 300 µM) ein höheres Überleben festgestellt werden, wobei die maximale Verlängerung der mittleren Lebensdauer bei einer Dosis von 200 µM beobachtet wurde. In höheren Dosen (800 – 1000 µM) konnte wiederum eine verkürzte mittlere Lebensdauer beobachtet werden. Wichtig dabei ist vor allem ein Mechanismus welcher im Zusammenhang mit dem AMPK/SIRT1/FOXO Signalweg steht. Die Studiendaten legen eine induzierbare, AMPK/SIRT1/FOXO-abhängige Signalkaskade nahe, welche in unterschiedlichen Zusammenhängen aufgerufen werden könnte, um eine verlängerte gesunde Lebensdauer zu bewirken. Ein Benefit konnte speziell für junge Erwachsene und Erwachsene mittleren Alters festgestellt werden, in höherem Alter hingegen nahmen die Wirkungen ab (159). Polyphenole in hohen Dosen sollen möglicherweise Aussicht auf neue Therapiestrategien im Sinne von Chemotherapeutika oder Senolytika

geben. Es gibt sehr viele verschiedene Ansätze über ROS-modulierende Strategien die Lebensqualität in Form von „gesundem Altern“ zu verbessern, der Kern dieser Arbeit wird in diesem Zusammenhang allem voran den Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen näher beleuchten. Sich an den vorher genannten Kriterien orientierend, sollen dazu zugelassene, kardioprotektive Substanzen, wie Beta-Blocker, ACE-Hemmer, AT1-Antagonisten und Statine auf etwaige ROS-modulierende Mechanismen geprüft werden. Dabei sollen die unterschiedlichen Effekte dieser Wirkstoffe auf physiologische und pathophysiologische Zustände analysiert werden.

## **Beta-Blocker**

Als Beta-Blocker werden Wirkstoffe bezeichnet, die G-Protein gekoppelte, beta-adrenerge Rezeptoren blockieren. Es existieren drei Subtypen dieser Rezeptoren, der  $\beta_1$ , der  $\beta_2$  und der  $\beta_3$  Rezeptor, diese befinden sich in verschiedenen Gewebetypen. Das Herz vereint alle dieser drei Subtypen, die Rezeptoren sind aber auch in den Gefäßen, der Niere, der Lunge und in Fettzellen anzutreffen. 1958 wurde der erste  $\beta$ -Rezeptor Antagonist vorgestellt, seither wurden die Wirkstoffe kontinuierlich über drei Generationen hinweg weiterentwickelt (160). Beta-Blocker haben sich im Laufe der Jahre eine feste Position in der Therapie von Bluthochdruck, Arrhythmien, Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit gesichert. Man unterscheidet zwischen selektiven Beta-Blockern und nicht-selektiven Beta-Blockern, wobei Beta-Blocker der ersten Generation nicht-selektiv  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren blockieren, Beta-Blocker der zweiten Generation selektiv hauptsächlich  $\beta_1$  Rezeptoren blockieren und Beta-Blocker der dritten Generation zusätzlich vasoaktive Eigenschaften, wie die Blockade von  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren, die Stimulation der  $\beta_2$  Rezeptoren oder die Produktion von NO aufweisen (161). Beta-Blocker nehmen über unterschiedliche Mechanismen auch Einfluss auf die ROS Homöostase, so verhindert die Inhibierung des  $\beta_1$  Rezeptors das Generieren von Katecholamin-induziertem, oxidativen Stress. Die Inkubation von Kardiomyozyten aus Ratten mit Adrenalin erhöhte die Aktivität der mitochondrialen Komplexe und bewirkte eine vermehrte Expression von Superoxiddismutase 2, die potenziell durch eine erhöhte ROS Produktion und Freisetzung von ROS aus der aktiveren Atmungskette zu erklären ist (162). Gleichzeitig reduzieren Beta-Blocker durch ihre antihypertensiven Eigenschaften die mechanische Belastung auf die Gefäßwände, wodurch indirekt die ROS Produktion in diesen reduziert wird. Eine erhöhte mechanische Belastung des vaskulären Endothels wird mit

vermehrt anfallendem oxidativen Stress und der Aktivierung von Monozyten assoziiert (163). Zusätzlich zu diesen Effekten weist der nicht-selektive Beta-Blocker Carvedilol antioxidative Eigenschaften auf und kann direkt als ROS *Scavenger* fungieren und die ROS Produktion von Leukozyten inhibieren (164). Wesentliche Erkenntnisse der *in vitro* Studien im Zusammenhang mit den durch Carvedilol ausgelösten subzellulären ROS-modulierenden Mechanismen sollen im Weiteren vorgestellt werden und in der „Tabelle 1: Übersicht Beta-Blocker“ als Zusammenfassung präsentiert werden. Zu diesem Zweck wurden unter anderem Mitochondrien aus Rattenherzen isoliert und verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Die erste Studie ermittelte den antioxidativen Einfluss von Carvedilol auf die Inhibierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition (MPT) (165). Die antioxidativen Eigenschaften des Carvedilol wurden über den Gehalt an Protein-Thiol Gruppen (P-SH) der mitochondrialen Membran gemessen. Als Referenz zur Carvedilol-Gruppe wurde Cyclosporin A verwendet, ein bekannter, von antioxidativen Prozessen unabhängiger MPT-Inhibitor. Um die exakte inhibitorische Wirkung von Carvedilol zu detektieren, wurde die MPT auf mehrere verschiedenen Arten induziert (166). Die Studie ergab, dass sich Carvedilol (20 µM) nur dann effektiv gegen Auslöser der MPT in kardialen Mitochondrien zeigte, wenn diese abhängig von P-SH Oxidation sind bzw. eine primär oxidative Ursache aufweisen. So zeigte Carvedilol dieselbe Schutzwirkung wie Cyclosporin A, wenn die Versuchsmitochondrien mit Kalzium (100 µM) und t-Butylhydroperoxid (1mM) inkubiert wurden. Bei nicht oxidativen Induktoren der MPT zeigte Carvedilol nur teilweise oder sogar gar keine Wirkung (166). Neben der Wirkung auf die P-SH Gruppen nach ischämischen Prozessen, zeigt Carvedilol auch Wirkung auf den erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und die ROS Produktion unter Bedingungen eines akuten Herzversagens. Diese Bedingungen wurden, ähnlich zur vorherigen Studie, mit einer hohen Kalziumkonzentration (10 – 100µmol/L) und der Kombination mit Rotenon, einem Komplex I Inhibitor, simuliert. Carvedilol (1 µmol/L, 10 µmol/L, 100 µmol/L) war im Gegensatz zu Metoprolol, einem anderen Beta-Blocker, in der Lage dosisabhängig den erhöhten, kalziumvermittelten Sauerstoffverbrauch sowie die ROS Produktion signifikant zu senken. Besonders im hohen Konzentrationsbereich (100 µmol/L) zeigte der Wirkstoff eine deutliche Reduktion von Malondialdehyd (MDA), einem Marker für Lipidperoxidation (167, 168). Im Zusammenhang mit mitochondrialer Dysfunktion steht auch die Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP), in Studien mit humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (Nabelschnurothelzellen) und Neuro2a (N2a) Zellen von Mäusen stellte Carvedilol nachweislich das durch toxische Substanzen

(Doxorubicin, Wasserstoffperoxid) erniedrigte Membranpotential wieder her (169, 170). Auch hier machte sich ein dosisabhängiger Effekt bemerkbar, Carvedilol (20  $\mu\text{M}$ ) hatte einen stärkeren Effekt als Carvedilol (10  $\mu\text{M}$ ). Neben der Wirkung auf das Membranpotential wurden auch die durch Wasserstoffperoxid (100  $\mu\text{M}$ ) verminderten Adenosintriphosphat (ATP) Spiegel durch Carvedilol ausgeglichen (169). Interessanterweise ergab die Studie, in der die Nabelschnurendothelzellen mit Carvedilol (5  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt wurden, dass dessen membranstabilisierende Wirkung nur bei der Verwendung des (*S*)-Enantiomers und in abgeschwächter Form bei Anwendung von racemischen Carvedilol beobachtbar war. *R*-Carvedilol hingegen bewirkte keine signifikante Änderung (170). Als Folge des Zusammenbruches des MMP wird vermehrt Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol freigesetzt, was wiederum die Aktivierung von Caspase -3 nach sich zieht. Die Caspase -3 zählt als wichtiger Initiator der Apoptose (171). Wenig überraschend ist es also, dass sowohl die Freisetzung von Cytochrom C als auch die damit verbundene Aktivierung der Caspase -3 ebenfalls durch den Einfluss von Carvedilol vermindert wurden. N2a/Swe.D9 Zellen, eine Presenilin-Exon9-Deletionsmutante der N2a Zellen, die mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu ihrer unbehandelten Kontrollgruppe einen wesentlich höheren Cytochrom C Spiegel auf. In einer Western Blot Analyse zeigte sich, dass dieser Anstieg signifikant ( $p < 0,01$ ) und dosisabhängig durch die Therapie mit Carvedilol (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) verringert wurde. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Caspase -3 Aktivität, auch diese konnte bei gleicher Methodik signifikant durch Zusatz des Wirkstoffes gesenkt werden (169). Zu sehr ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie, welche den Einfluss von Carvedilol auf Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität untersuchte. In dieser wurden H9C2 Kardiomyozyten für 24 h mit Doxorubicin (0,5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend mit Carvedilol (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Mit dem Ziel die Apoptose- und Autophagie-Raten genauer zu untersuchen, wurde wiederum eine Western Blot Analyse der Zellen durchgeführt und neben der Expression des pro-apoptischen Proteins BAX sowie des anti-apoptischen Proteins BCL2 auch die Caspase -3 Aktivität analysiert. Die Resultate ergaben, dass die durch Doxorubicin erhöhte BAX Expression und Caspase -3 Aktivität durch die Behandlung mit Carvedilol (10  $\mu\text{M}$ ) signifikant reduziert wurden ( $p < 0,01$ ), während im Gegensatz dazu das anti-apoptisch wirkende Protein BCL2 vermehrt exprimiert wurde ( $p < 0,01$ ). Infolgedessen senkte sich auch die Anzahl der im Fluoreszenzmikroskop beobachtbaren apoptotischen Zellen. Die Doxorubicin-induzierte Akkumulation des Autophagie-Markers EGFP-LC3B senkte sich ebenfalls durch die Applikation von Carvedilol ( $p < 0,05$ ) (172).

Der anti-apoptotische Effekt von Carvedilol wurde nicht nur bei den H9C2 Kardiomyozyten festgestellt, sondern auch in den bereits erwähnten N2a/Swe.D9 Zellen, Nabelschnurendothelzellen und in Knochenmarksstammzellen (BMSCs). In den Publikationen wurden bei den verschiedenen Zelltypen auf teils unterschiedliche Art Apoptose-Marker gemessen, welche letzten Endes zum gleichen Ergebnis führten. Carvedilol vermindert die Anzahl der Apoptosen bei Zellen unter pathologischen Bedingungen. (169, 170, 172, 173). Um anti-apoptotische Kapazität von Carvedilol in N2a/Swe.D9 Zellen zu detektieren, wurden die Zellen 24 Stunden lang mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit oder Abwesenheit von Carvedilol (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) inkubiert, die Zelltodmuster mittels Laktatdehydrogenase (LDH) Assay untersucht und die Ergebnisse anschließend mit den Werten einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Zusätzlich wurden die charakteristischen Veränderungen der Zellkerne bei Apoptose mittels Fluoreszenzmikroskop beobachtet, in diesem Fall wurde jedoch nur eine Dosierung von 20  $\mu$ M Carvedilol verwendet (169). Genau wie in den bereits vorher beschriebenen Versuchen mit in N2a/Swe.D9 Zellen wurde abermals ein dosisabhängiger Ausgang des Experiments erzielt. Der Apoptose-Marker LDH wurde in Präsenz von Carvedilol in deutlich geringeren Mengen freigesetzt ( $p < 0,01$ ). Die durch Wasserstoffperoxid Inkubation stark vermehrte auftretenden apoptotischen Zellkerne zeigten sich auch bei dieser Methode deutlich vermindert ( $p < 0,01$ ) (169). Im Gegensatz dazu berief man sich in einer Studie, in der die Schutzfunktion von Carvedilol vor Wasserstoffperoxid-induziertem Stress auf BMSCs untersucht wurde, auf ein Hochest 33258 Assay, bei dem ähnlich der TUNEL-Methode Veränderungen des Zellkerns in Form von nukleärer Kondensation mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden und ein Annexin-V-FITC Assay, welches die Verhältnisse der apoptotischen Zellen ermittelt (173). Carvedilol (5  $\mu$ M) blockierte einerseits die Wasserstoffperoxid-induzierten Änderungen in den Nuclei, andererseits senkte es drastisch den Anteil früh-apoptotischer Zellen von 9,64% ( $\pm 0,08\%$ ) auf 5,82% ( $\pm 1,57\%$ ). Darüber hinaus wurden die durch Wasserstoffperoxid veränderten Proteinkonzentrationen von BAX und BCL2 durch den Zusatz von Carvedilol weitestgehend aufgehoben (173). Beim Untersuchen der Nabelschnurendothelzellen zeigte sich auch eine signifikante Verminderung der Apoptosen bei Doxorubicin (2  $\mu$ M) inkubierten Zellen, wenn diese mit *S*-Carvedilol (5  $\mu$ M) oder racemischem Carvedilol (5  $\mu$ M) vorbehandelt wurden ( $p < 0,05$ ). Keine Wirkung zeigte wiederum die Behandlung mit *R*-Carvedilol (170). Hand in Hand mit den Apoptose-Zahlen geht die Zellüberlebensfähigkeit, welche ebenso eng mit der exzessiven Produktion von ROS vergesellschaftet ist. Es wurde bei verschiedenen Zelltypen,

mit teilweise unterschiedlichen Methoden, die Überlebensfähigkeit gemessen. Dabei verwendete man teils variierende Konzentrationen von Carvedilol, dennoch wiesen alle Experimente auf eine verbesserte Überlebensfähigkeit der Zellen unter pathologischen Bedingungen hin.

Die Überlebensfähigkeit von N2a/Swe.D9 Zellen wurde über deren metabolische Aktivität mittels MTT Assay gemessen. Um eine für das Überleben der Zellen unbedenkliche Dosierung von Carvedilol zu ermitteln, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes inkubiert (2 nm, 20 nM, 200 nM, 2 µM, 20 µM, 200 µM, und 2 mM). Die Verwendung von 200 µM resultierte in einer signifikanten Verminderung des mittleren Zellüberlebens, bei allen Werten unterhalb dieser Konzentration gab es keine eindeutigen Abweichungen vom Überleben verglichen mit unbehandelten Zellen. Aus diesem Grund wurden in der Studie die Konzentrationen 10 µM und 20 µM verwendet, um die protektive Wirkung von Carvedilol vor Wasserstoffperoxid-induziertem Stress zu testen. Die Studie ergab, dass Carvedilol (10 µM, 20 µM) dosisabhängig einer Wasserstoffperoxid-induzierten Verminderung der N2a Zellüberlebensfähigkeit entgegenwirkt ( $p < 0,01$ ) (169). Die Untersuchung auf die Überlebensfähigkeit mittels MTT Assay wurde auch bei den BMSCs durchgeführt, in dieser Studie testete man auch gleich mehrere Konzentrationen Carvedilol (1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM). Die BMSCs wurden mit den jeweiligen Konzentrationen vorbehandelt und anschließend über den Zeitraum von 24 h mit Wasserstoffperoxid (600 µM) inkubiert. Bei einer Konzentration von 5 µM konnte eine signifikant höhere Überlebensfähigkeit im Vergleich zu rein mit Wasserstoffperoxid (600 µM) behandelten BMSCs beobachtet werden. Carvedilol-Konzentrationen von 1 µM und 2,5 µM zeigten keine signifikante Erhöhung der Zellüberlebensfähigkeit, bei 10 µM war das Überleben zwar ebenfalls signifikant höher, jedoch niedriger als bei einer Konzentration von 5 µM (173). Des Weiteren wurden Nabelschnurendothelzellen 6 h lang entweder mit racemischem Carvedilol (5 µM) oder einem Carvedilol-Enantiomer (R-CAR, S-CAR; 5 µM) vorbehandelt und anschließend 2 h lang mit Doxorubicin (2 µM) stimuliert. S-Carvedilol steigerte die durch Doxorubicin reduzierte Überlebensfähigkeit signifikant ( $p < 0,05$ ), R-Carvedilol zeigte keinen relevanten Effekt (170). Auch H9C2 Kardiomyozyten wurden nach Vorbehandlung mit Carvedilol (10 µM) für 24 h mit Doxorubicin (0,5 µM) inkubiert. Die Zellüberlebensfähigkeit gegenüber Doxorubicin-behandelter Zellen stieg signifikant ( $p < 0,05$ ) (172). In der letzten Studie wurden primär adulte Spinalganglien (DRG) von Ratten entnommen und zu verschiedenen Zeitpunkten mit (2h, 4h, 6h, 24h) mit einer hohen Dosis Glukose (G; 45 mM) inkubiert, was das Gesamtüberleben gegenüber der Kontrollgruppe

(Glukose 25mM) nach 24 h auf 72% senkte. Carvedilol (10  $\mu$ M) erhöhte das Zellüberleben der HG Gruppe auf über 18% ( $p = 0,001$ ) (174). Neben den bereits erwähnten mitochondrialen antioxidativen Mechanismen (P-SH Oxidation) konnten auch zahlreiche Änderungen auf zellulärer Ebene festgestellt werden. Einerseits wurden die ROS Produktion sowie ROS-assoziierte Effekte, wie die Lipidperoxidation reduziert, andererseits konnte man eine Erhöhung antioxidativer Proteine wie Glutathion (GSH) beobachten. Die Applikation von Carvedilol konnte unter Stressbedingungen die ROS Spiegel in N2a/Swe.D9 Neuroblastom-Zellen, H9C2-Zellen, isolierten Rattenherz-Mitochondrien und BMSCs signifikant senken (168, 169, 172, 173). Im völligen Kontrast dazu steht eine Studie mit H9C2 Kardiomyozyten, in der sich durch die Behandlung von gesunden Zellen mit Carvedilol, vor allem bei Konzentrationen von 10  $\mu$ M und 20  $\mu$ M, die ROS Spiegel erhöhten (175). Einheitlicher stellten sich die Ergebnisse im Bereich der antioxidativen Abwehr der Zellen dar. So steigerte sich bei Doxorubicin-behandelten Nabelschnurendothelzellen durch racemisches und *S*-Carvedilol die Superoxiddismutase Aktivität, während sich der Malondialdehyd (MDA) Gehalt senkte (170). Die gleiche Wirkung hatte Carvedilol auf Doxorubicin-behandelte H9C2 Kardiomyozyten. Darüber hinaus wurde bei den Myokardzellen noch festgestellt, dass sich der induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) Spiegel bei Carvedilol-Therapie deutlich reduziert, während die Expression von Hämoxxygenase (HO-1) und NRF2 signifikant erhöht wird ( $p < 0,01$ ) (172). Der GSH-Gehalt konnte einerseits in den mit Wasserstoffperoxid-inkubierten BMSCs, andererseits in den Wasserstoffperoxid-ausgesetzten H9C2 Zellen durch Carvedilol signifikant erhöht werden (173, 175). Bei unbehandelten H9C2 Myokardzellen, führte der Zusatz von Carvedilol zu einer Steigerung des GSH-Gehalts um 16% und des P-SH Gehalts um 22% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) blieb hingegen unverändert. Bei Zellen, die nach Carvedilol-Behandlung für 2 h mit Wasserstoffperoxid (50, 100, 200  $\mu$ M) inkubiert wurden, wies die Carvedilol Gruppe im Vergleich zur Wasserstoffperoxid-Gruppe einen bis zu 46% höheren GSH und P-SH Gehalt ( $p < 0,01$ ) auf, während der GSSG Gehalt bis zu 68% niedriger war ( $P < 0,01$ ) (175). Die Inkubation der H9C2 Zellen mit Wasserstoffperoxid führte zu einer signifikanten, dosisabhängigen Verminderung der endogenen, DNP-entkoppelten Atmungsaktivität und einer Hemmung des maximalen Atemflusses durch NAD-abhängige Substrate und durch Succinat. Die Vorbehandlung der Zellen mit Carvedilol führte zu einer teils signifikant besseren Funktion der mitochondrialen Atmungskettenfunktion und somit zu einer schützenden Wirkung vor Wasserstoffperoxid - induziertem oxidativen Stress. Der Effekt wurde jedoch nicht bei gleichzeitiger Inkubation

der Zellen mit Wasserstoffperoxid und Carvedilol beobachtet (175). Ein weiterer Effekt, der durch die Therapie mit Carvedilol beobachtet wurde, ist seine antiinflammatorische Wirkung bei Doxorubicin-behandelten H9C2 Zellen, es senkte in diesen die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, COX2, IL-1 $\beta$ , IL-18 und p-NF- $\kappa$ B signifikant (172). Zudem mediiert Carvedilol die Aktivierung des Phosphoinositid 3-Kinase/AKT/endothelial Nitric Oxide Synthase (PI3K/AKT/eNOS) Signalweges. Die 24 h lang dauernde Behandlung von Nabelschnurendothelzellen mit Doxorubicin verringerte stark die Konzentrationen phosphorylierter PI3K, AKT und eNOS in Relation zur Kontrollgruppe. Vor allem die Vorbehandlung mit S-CAR konnte die durch Doxorubicin verringerten Konzentrationen von p-PI3K, p-AKT und p-eNOS stark erhöhen ( $p < 0,05$ ) (170). Außerdem untersuchte man noch den antioxidativen Effekts von Carvedilol auf Ryanidin Rezeptoren (RyR2) in Hundeherzen. Freie Thiole in den RyR2 waren bei Herzversagen wegen vermehrter Oxidation erniedrigt, Carvedilol normalisierte den erniedrigten Wert. Um festzustellen, ob der präventive Effekt von Carvedilol wirklich auf dem Verhindern der Oxidation von RyR2 basiert, wurde die Wirkung von Carvedilol auf 3-Morpholinosydnonimine-induzierte (SIN-1) RyR2-Oxidation analysiert. SIN-1 oxidiert RyR2 und generiert dadurch das Oxide-Related-Species-Peroxyinitrid ( $\text{OONO}^\cdot$ ), was wiederum die Anzahl der freien Thiole der RyR2 senkt. Bei gleichzeitiger Gabe von Carvedilol (100  $\mu\text{mol/l}$ ) war die Anzahl der freien Thiole deutlich höher als ohne Carvedilol, was impliziert, dass Carvedilol RyR2 tatsächlich vor Oxidation schützt. Carvedilol, welches erst nach Auswaschen von SIN-1 appliziert wurde, erhöhte die Anzahl an freien Thiolen jedoch nicht, was wiederum impliziert, dass Carvedilol als *Scavenger* von  $\text{OONO}^\cdot$  fungiert und nicht die bereits oxidierten Thiole wieder reduziert (176). In den *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass Carvedilol die Aktivität antioxidativer Enzyme, wie Glutathion-Peroxidase (GSH-Px), Superoxiddismutase und Katalase in Versuchstieren steigert (177-182), während es Biomarker für oxidativen Stress, wie MDA senkt (179-183). Die erste Studie beispielsweise zeigt, dass bei Ratten, die 14 Tage lang über eine Magensonde mit Carvedilol (2 mg/kg/Tag) behandelt wurden, davon die letzten 10 Tage mit Isoprenalin (3 mg/kg/Tag), um eine Herzschädigung herbeizuführen, signifikant höhere Superoxiddismutase und Katalase Aktivität aufweisen und sich gleichzeitig die Thiobarbitursäure Reaktiven Substanzen (TBARS) signifikant verringern ( $p < 0,001$ ) (177). In einer sehr ähnlichen Studie des gleichen Autors erhielten die Versuchsratten drei Wochen lang Carvedilol (10 mg/kg) mit anschließender Gabe von Isoprenalin (150 mg/kg, s.c.). Wie auch in der Studie zuvor erhöhte sich hier die Superoxiddismutase ( $p < 0,05$ ) und Katalase

( $p < 0,01$ ) Aktivität, während sich die TBARS verminderten ( $p < 0,001$ ) (178). Auf subzellulärer Ebene verminderte eine 10-tägige Vorbehandlung mit Carvedilol (5 mg/kg/Tag) den Anstieg von Kalziumionen als auch die vermehrte Wasserstoffperoxid Produktion in Mitochondrien ( $p < 0,05$ ) der linksventrikulären Herzspitze von Ratten, die mit Isoproterenol (ISOP, 1 mg/kg, s.c.) injiziert wurden. Die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition Poren (mPTP) in der linken Herzspitze von ISOP behandelten Ratten wurde ebenfalls durch Carvedilol signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ), dadurch verringerte sich folglich die osmotische, mitochondriale Schwellung. Folge von vermehrter mPTP Öffnung können Nekrose und Vernarbung des Myokards und neurodegenerative Veränderungen sein (50, 184). Bei Hasen mit Cholesterol-reicher Diät verminderte der Zusatz von Carvedilol (20 mg/kg) die Hyperplasie der Neointima in der abdominalen Aorta. Als Mechanismus dahinter stecken die Inhibierung der Expression der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 und eine verringerte oxidative DNA-Schädigung in der Neointima durch den Wirkstoff (185). In einer zusätzlichen *in vitro* Studie wurde gezeigt, dass die Wirkung auf die MMP-2 und MMP-9 zwar durch Carvedilol (5  $\mu\text{mol/L}$ ), nicht jedoch durch Propranolol (5 – 20  $\mu\text{mol/L}$ ) und Prazosin (5 – 20  $\mu\text{mol/L}$ ) Vorbehandlung gezeigt werden konnte was impliziert, dass sich der Effekt auf die antioxidativen Eigenschaften und nicht die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -blockierende Wirkung von Carvedilol zurückführen lässt (185). Darüber hinaus reduzierte Carvedilol drastisch die Proteinoxidation im Vergleich zur chronic heart failure (CHF) Gruppe ( $p < 0,001$ ). Es wurde in der Oxyblot Färbung festgestellt, dass sarkomerische Proteine, die schweren Ketten von Myosin, Aktin und Tropomyosin im M. Soleus von CHF Ratten vermehrt oxidiert waren. Die durch chronisches Herzversagen verringerte Kontraktion des *musculus soleus*, in Form von geringerem Muskelzucken und tetanischer Spannung, konnten durch Carvedilol wiederhergestellt werden ( $p < 0,03$ ). Bisoprolol wies diese Wirkung im Experiment nicht auf (186). Verglichen mit Bisoprolol weist Carvedilol bessere Wirksamkeit in der Reduktion von oxidativem Stress bei chronischem Herzversagen auf. Bei 26 Patient\*innen einer Bisoprolol Gruppe und 22 Patient\*innen einer Carvedilol Gruppe wurden Derivate von Reaktiven-Sauerstoff-Metaboliten (d-ROMs) zu Beginn und nach 24 Wochen gemessen. Nach der Randomisierung wurde mit 2,5 mg/Tag Carvedilol gestartet und die Dosis alle 2 Wochen, bis 20 mg/Tag erreicht wurden, verdoppelt. Die Spiegel der d-ROMs verminderten sich in beiden Gruppen, Carvedilol zeigte aber eine stärkere Signifikanz als Bisoprolol (CAR  $p = 0,006$ , BIS  $p = 0,015$ ). Zwischen den Änderungen der d-ROMs und dem Entzündungsmarker High-sensitivity C-reaktives Protein (hsCRP) wurde eine schwache Korrelation hergestellt

( $R = 0,444$ ,  $p = 0,005$ ) (187). Während Nebivolol seine blutdrucksenkende Wirkung teilweise über die  $\text{NO}_2$  Konzentration steuert, steuert Carvedilol diese eher über eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität. 44 Patient\*innen mit essenziellem Hypertonus wurden in einer randomisierten, single-blind Studie in eine Carvedilol Gruppe ( $n = 23$ , 12,5 mg/Tag) und eine Nebivolol Gruppe ( $n = 21$ , 5 mg/Tag) geteilt. Die Therapie wurde für 12 Wochen durchgeführt. Die Resultate ergaben, dass sowohl Nebivolol (7,3%) als auch Carvedilol (8,1%) eine erhöhte Endothel-abhängige Dilatation durch reaktive Hyperämie verursachten ( $p < 0,05$ ). Verglichen mit den Basalwerten wies die Carvedilol Gruppe deutlich geringere 8-Isoprostan (28,1%) und Erythrozyten MDA (23,6%) Spiegel auf ( $p < 0,05$ ). Die Eisen-reduzierende Fähigkeit des Plasmas (FRAP) und GSH/GSSH Verhältnisse zeigten sich nach Therapie mit Carvedilol um 31,5% bzw. 29,6% höher als zum Zeitpunkt der Messung der Basalwerte ( $p < 0,05$ ). Die  $\text{NO}_2$  Konzentration wurde durch Carvedilol nicht beeinflusst (188). Bei Patient\*innen mit nicht ischämischem Herzversagen zeigten Carvedilol und Nebivolol ähnliche Wirkung auf den oxidativen Stress Status (189). In einer kleinen Studienpopulation von Patient\*innen ( $n = 30$ ) mit stabiler Angina Pectoris zeigte Carvedilol eine Verbesserung der antioxidativen Abwehrmechanismen. Im Verlauf einer 12-wöchigen Therapie erhöhten sich die Erythrozyten Superoxiddismutase 1 (SOD-1) Aktivität als auch die GSH-Px Aktivität der Teilnehmer\*innen (190). Bei Patient\*innen mit mildem Hypertonus wurden DNA-Schäden vor und nach Therapie mit Carvedilol gemessen. Nach 2 Monaten Therapie zeigte die Carvedilol Gruppe eine signifikante Verminderung von hs8-OHdG im Plasma verglichen mit dem Wert vor der Therapie. Weder in der Hydrochlorothiazid-Gruppe noch in der gesunden Kontrollgruppe konnte man im selben Zeitraum eine signifikante Änderung des hs8-OHdG feststellen. Man konnte bei jedem einzelnen Individuum der Carvedilol Gruppe eine Reduktion von hs8-OHdG innerhalb der 2 Monate beobachten (191). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Carvedilol subzellulär die MPT verhindert und das MMP wiederherstellt, während es gleichzeitig Apoptoseraten senkt und das Zellüberleben steigert. Dies geschieht einerseits über eine Senkung von oxidativem Stress, andererseits über eine Verbesserung der antioxidativen Abwehr.

*Tabelle 1: Übersicht Beta-Blocker*

<b>Beta-Blocker</b>	
Carvedilol	<b>Verhindert</b> MPT unter oxidativem Stress (166, 184), stellt erniedrigtes MMP wieder her (169, 170).

	<p><b>Senkt</b> Apoptose, <b>erhöht</b> Zellüberleben (169, 170, 172-174, 192), wirkt antiinflammatorisch (172, 192).</p> <p><b>Senkt</b> ROS Levels (168, 169, 172, 173), <b>erhöht</b> antioxidative Abwehr (170, 172, 174, 175, 177-182, 188, 190, 193), <b>senkt</b> Marker für oxidativen Stress (179-183, 187, 188, 191, 192, 194-197)</p>
--	--

### **ACE-Inhibitoren/AT1-Rezeptor Antagonisten**

ACE-Inhibitoren zählen zur Gruppe der Antihypertensiva, ihre Wirkung beruht auf dem Blockieren des *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), welches Angiotensin I und das vasokonstriktorisch wirksame Angiotensin II spaltet, während AT1 Antagonisten direkt inhibitorisch auf den AT1 Rezeptor wirken. Nach Zulassung des ersten nicht-selektiven Antagonisten für Angiotensin II Rezeptoren, welche in Form von Peptiden intravenös verabreicht wurden, wurden die oral applizierbaren ACE-Inhibitoren entwickelt (198). Seitdem haben sich ACE-Inhibitoren als „first-line“ Medikamente in der Therapie für essenziellen Hypertonus etabliert. Anwendung finden sie auch in der Therapie von Herzinsuffizienz, zur Prävention von Myokardinfarkten, bei chronischer Niereninsuffizienz und bei *Diabetes mellitus* (199). Während ACE- Inhibitoren über die Blockade des ACE zu einem Abfall des Angiotensin II Spiegel führen, bewirken Angiotensin1-Rezeptor Blocker einen progressiven Anstieg der Angiotensin II Spiegel was zu einer zusätzlich vermehrten Aktivierung der AT2-Rezeptoren im kardiovaskulären Gewebe mit erwünschten Effekten, wie Vasodilatation, führt (200-202). In der Effektivität der Blutdruckkontrolle und den primären Endpunkten Schlaganfall, Herzinfarkt und kardiovaskulärer Mortalität gibt es keine relevanten Unterschiede zwischen den ACE-Inhibitoren und den AT-1 Rezeptor Antagonisten, die AT-1 Antagonisten weisen jedoch ein etwas besseres Sicherheitsprofil bei unerwünschten anderen Wirkungen auf. Sie haben ein geringeres Risiko für Angioödeme, Husten, Pankreatitis und gastrointestinale Blutungen (203). Sowohl den ACE-Inhibitoren als auch den AT1-Rezeptor Antagonisten werden antioxidative Eigenschaften zugeschrieben, sie minimieren die Angiotensin II-medierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und können teilweise direkt als *Scavenger* für ROS agieren, wie in der „Tabelle 2: Übersicht ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor Blocker“ zusammenfassend dargestellt ist. Angiotensin II moduliert in Ratten mit Stress-induziertem Bluthochdruck den „Pressor Effekt“ nach der Bindung an den AT1-Rezeptor glutaminerger Neuronen. Unter dem „Pressor Effekt“

versteht man eine Erhöhung des Blutdruckes in Kombination mit einer auslösenden Substanz, zum Beispiel Angiotensin II. Nach dem Andocken von Angiotensin II an den Rezeptor werden über eine NOX-vermittelte ROS Bildung die Stress-aktivierte Proteinkinase/Jun N-Terminal Kinase (SAPK/JNK), die extrazelluläre Signal-regulierte Proteinkinase (ERK1/2) und die p-p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) aktiviert, welche zu vermehrter AT1-Rezeptor Expression, einer Glutamatfreisetzung im Nucleus Intermediolateralis, dem Kerngebiet des Sympathikus im Rückenmark, und in letzter Konsequenz zur Hypertonie führen. Mikroinjektionen mit Candesartan (2 nmol), einem AT1-Rezeptor Antagonist, inhibierte teilweise die ROS Produktion und die Phosphorylierung von SAPK/JNK, ERK1/2 und p38MAPK (204). Candesartan inhibiert darüber hinaus die TNF- $\alpha$  induzierte Expression der Entzündungsmarker Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL-6) in isolierten humanen embryonischen Epithelzellen der Niere, unabhängig von seiner Eigenschaft als AT1-Rezeptor Blocker. TNF- $\alpha$  induziert die Produktion von ROS, welche wiederum die Expression der genannten Entzündungsmarker ankurbelt. Der Effekt wurde dosisabhängig durch Zusatz von Candesartan vermindert. Die Ausschaltung des AT1-Rezeptors mittels small interfering RNA (siRNA) änderte nichts an der Unterdrückung der ROS Aktivität durch Candesartan, der AT1-Rezeptorblocker weist also zumindest eine teilweise direkt antioxidative Wirkung auf TNF- $\alpha$  vermittelte ROS auf und entfaltet dadurch seine antiinflammatorische Wirkung (205). In spontan hypertensiven Ratten verminderte Candesartan (1 mg/kg/Tag) oxidativen Stress über die reduzierte mRNA Expression von NADPH Oxidase Untereinheiten (206). Stamm- und Vorläuferzellen sind unentbehrlich in der fetalen Organogenese in der Embryonalentwicklung und werden assoziiert mit dem Erkennen von Zellschäden sowie der Reparatur geschädigter Organe. Oxidativer Stress beschleunigt die Seneszenz dieser Zellen und schränkt sie in ihrer Funktion ein (207). Candesartan scheint die Selbsterneuerung und Seneszenz kardialer, c-kit positiver Stammzellen über antioxidative Mechanismen zu regulieren, indem es die Expression von c-kit deutlich steigert (206). Die Flow-induzierte Vasodilatation wird mediiert durch Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine (PGI<sub>2</sub>) und dem *Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF), wie bereits beschrieben, beeinflussen freie Sauerstoffradikale diesen Mechanismus. Im Ablauf der Autoregulation und dem Blutfluss kleinster Blutgefäße scheint die Flow-induzierte Vasodilatation einen wichtigen Beitrag zu leisten, sowohl in pathologischen als auch in physiologischen Zuständen wird die Mikrozirkulation dadurch mitbeeinflusst (208, 209). In normotensiven Ratten wurde untersucht, welche Auswirkung die Blockade des AT1-Rezeptors auf die

physiologische, Flow-induzierte Vasodilatation in den mittleren Zerebralarterien aufweist. Es zeigte sich, dass die AT1-Rezeptor Blockade durch Losartan in einer verminderten Endothel-abhängigen Dilatation resultierte, während die Endothel-unabhängige Dilatation unverändert blieb. Die Blockade führte zu vermehrtem oxidativen Stress, verminderter Expression antioxidativer Enzyme und reduzierte NO-abhängige Vasodilatation durch eine geringere NO-Bioverfügbarkeit (210). Unter physiologischen Bedingungen erscheint das Inhibieren von AT1-Rezeptoren demnach als kontraproduktiv, die physiologische Antwort auf Änderungen des Blutflusses kann damit gestört werden. Unter pathologischen Bedingungen resultiert die exzessive Überstimulation der AT1-Rezeptoren hingegen ebenfalls in oxidativem Stress und vaskulärer Inflammation. Unter pathologischen Bedingungen erweist sich der Einsatz von Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) deshalb als hilfreich. Die Verwendung von ACE-Inhibitoren vermindert die Angiotensin II Spiegel und dadurch indirekt eine NADPH Oxidase Aktivierung mit Reduktion freier Sauerstoffradikale in vaskulärem Gewebe. Andererseits fällt durch die Hemmung des ACE vermehrt Bradykinin an, welches an den Bradykinin B2 Rezeptor bindet. Dies bewirkt eine Ausschüttung von NO und Prostacyclin, die maßgeblich zur Vasodilatation beitragen und oxidativen Stress reduzieren. Auf lange Sicht führt dies zu einer Verbesserung der arteriellen Gefäßversteifung (202). Hohe Level an oxidativem Stress sind mit vaskulärer Dysfunktion, Zellmembranschäden und Protein Glykosylierung assoziiert, Superoxidanionen reagieren mit NO und es entsteht Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), eine niedrige NO Bioverfügbarkeit wiederum führt zu gestörter Gefäßrelaxation über die vaskuläre glatte Muskulatur (211). ROS, Diabetes und die kardiovaskuläre Funktion hängen eng zusammen. Der oxidativ/antioxidative Status diabetischer Ratten lag unter Therapie mit Losartan zwar noch deutlich unter dem von nicht-diabetischen Ratten, verbesserte sich im Vergleich zu diabetischen Ratten jedoch signifikant (212). Diabetes wird für gewöhnlich von oxidativem Stress begleitet, welcher mit morphologischen Veränderungen und Gewebeschädigung vergesellschaftet ist. Die Veränderungen entstehen üblicherweise aufgrund einer Imbalance zwischen ROS Produktion und Elimination. Die Langzeitbehandlung diabetischer Ratten mit Lisinopril (5 mg/kg/d) senkte die Produktion von ROS sowie phänotypische Veränderungen des Herzens und der Aorta (213). Endotheliale Dysfunktion wird häufig über die Verminderung des endothelialen NO definiert und gilt als Vorläufer für Hypertonie und Atherosklerose. Erhöhte Mengen an Superoxidanionen bauen das endotheliale NO rasch ab und führen zu verminderter NO Bioaktivität sowie zu endothelialer Dysfunktion bei Diabetes. In der Gefäßwand und in den

Glomeruli der Nieren zählen die NOX und die entkoppelte eNOS zu den wichtigsten Produktionsstätten für Superoxidanionen (214, 215). Die Blockade des Angiotensin II Signalweges mit Losartan in diabetischen Glomeruli verbesserte das Dimer/Monomer Verhältnis der eNOS und reduzierte dadurch einerseits die ROS Produktion und erhöhte andererseits die NO Bioverfügbarkeit. Diabetische Ratten weisen eine verminderte Bioverfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin (BH4), einem Co-Faktor der eNOS, auf, was ebenfalls zu Superoxid-Freisetzung und geringerer NO Produktion führt. Losartan reduzierte die Oxidation von BH4 zu BH2 bei diabetischer Nephropathie und erhöhte somit die Bioverfügbarkeit von BH4 im Serum (216). Captopril und Candesartan wiesen ähnliche Effekte auf, sie dämpften darüber hinaus die Aktivität der nicht-endothelialen NOX in Mäusen. Die Wirkstoffe stellten die Expression von Dihydrofolat Reduktase (DHFR), einem Schlüsselenzym in der Aktivierung von BH4, wieder her (217). Üblicherweise geht das Altern mit progressiv degenerativen Veränderungen einher. Die altersbedingte Degeneration von Gewebe ist eine fundamentale Eigenschaft des biologischen Lebens und die treibende Kraft für Funktionsstörungen bis hin zum Tod von Organismen. Die Hemmung von *acn-1*, dem Äquivalent des ACE in *C. elegans*, mit einem ACE-Inhibitor (Captopril) zeigte eine deutliche und dosisabhängige Verbesserung der degenerativen Veränderungen in den Würmern und eine signifikante Verlängerung in deren mittleren Lebensspanne, um bis zu 28% (218). Enalapril und Losartan zeigten vorteilhafte Wirkungen in Bezug auf altersassoziierte mitochondriale Dysfunktion. Eine Inhibierung des RAAS über längere Zeiträume zeigte unter Therapie mit den beiden Wirkstoffen eine Verminderung in Änderungen der mitochondrialen Funktion und Struktur. Die Nierenfunktion ist stark abhängig von der Versorgung mit mitochondrialem ATP und deshalb ungemein anfällig für einen altersbedingten Abfall der mitochondrialen Energieversorgung. Renale Mitochondrien werden durch den inhibitorischen Eingriff in das RAAS vor den Auswirkungen des Alterns, wie der Abnahme der Kapazität für Energieproduktion oder die vermehrte Erzeugung mitochondrialer ROS, geschützt (219). Im Alter treten kardiovaskuläre Erkrankungen gehäuft auf, die Gefäßwand der Aorta verdickt sich, während ihre Compliance im Laufe der Zeit kontinuierlich abnimmt, dies stellt letzten Endes einen Risikofaktor für linksventrikuläre Hypertrophie dar (220). Vaskuläre Endothelschäden ausgelöst durch oxidativen Stress sind verknüpft mit Angiotensin II und seiner Bindung an den AT1-Rezeptor. Enalapril, ein ACE-Inhibitor, und Losartan, ein A1-Rezeptor Antagonist, wurden verwendet, um RAAS zu blockieren und sorgten für eine deutliche Reduktion altersbedingter Veränderungen in der Morphologie des Herz- und Aortengewebes in Ratten.

Zusätzlich erhöhte sich die Lebensspanne der therapierten Ratten verglichen mit vollkommen unbehandelten Ratten signifikant. Es gab keine Unterschiede in den Todesursachen behandelter und unbehandelter Ratten, nur der Gewichtsverlust setzte in therapierten Ratten später ein, was impliziert, dass der lebensverlängernde Effekt nicht auf die kardiovaskuläre Schutzwirkung der Wirkstoffe zurückzuführen ist (221). Telmisartan, ein weiterer A1-Rezeptor Blocker unterdrückte zum Teil über antioxidative Mechanismen erfolgreich die Bildung von Atherosklerose in Apolipoprotein E (apoE) defizienten Mäusen. Die Superoxidproduktion in allen Schichten der aortalen Gefäßwand, speziell im Endothel, wurde unabhängig vom blutdrucksenkenden Effekt durch den Wirkstoff unterdrückt. Die NADPH abhängige Oxidase Aktivität verringerte sich bereits bei Dosen, die den Blutdruck nicht veränderten. Tatsächlich änderte sich nicht nur der oxidative Status im Endothel, auch systemische Marker für oxidativen Stress verringerten sich im Plasma und im Urin der Versuchstiere (222). In der Therapie der koronaren Herzkrankheit kommt häufig Nitroglycerin (GTN) zum Einsatz. Die chronische Gabe von GTN ist allerdings mit negativen Auswirkungen auf die endotheliale Funktion und die Phosphorylierung bzw. S-Glutathionylation der eNOS vergesellschaftet. GTN reguliert die Expression von GCH-1, dem wichtigsten Enzym in der Synthese für BH<sub>4</sub>, herab. Eine Nitrattoleranz ist mit verstärkter Produktion von mitochondrialen ROS und einer verminderten Expression der mitochondrialen Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH-2), einem potenten kardioprotektiven, anti-ischämischen Enzym, assoziiert. Alle diese negativen Effekte wurden durch den AT1-Rezeptor Blocker Telmisartan und seinen antioxidativen Eigenschaften vermindert (223). Bei Patient\*innen mit Bluthochdruck und Übergewicht bewirkte eine Kombinationstherapie mit Candesartan und Lacidipin, einem Calciumkanal Antagonisten, eine verbesserte endotheliale Funktion, reduzierte oxidativen Stress und verminderte Anzeichen für endotheliale Dysfunktion (224). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Vergleichsstudie mit 365 Patient\*innen. Diese ergab, dass Candesartan verglichen mit Beta-Blockern, Kalziumkanalblockern und Diuretika eine stärkere Reduktion der Entzündungsmarker Pentraxin-3 (PTX3) und hs-CRP bewirkt (225). ACE-Inhibitoren wirken lebensverlängernd auf Modellmechanismen, sie reduzieren die ROS-Last einerseits über eine verminderte Aktivität der nicht-endothelialen NOX, andererseits über eine Steigerung der BH<sub>4</sub> Verfügbarkeit. AT1- Rezeptor Blocker haben ebenfalls das Potential das Leben von Modellorganismen zu verlängern, sie wirken anti-inflammatorisch, reduzieren die NOX Aktivität, verbessern die mitochondriale Funktion und erhöhen ebenfalls die BH<sub>4</sub> Bioverfügbarkeit.

Tabelle 2: Übersicht ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor Blocker

<b>ACE-Inhibitoren</b>	
Captopril	<b>Reduziert</b> Aktivität nicht-endothelialer NOX (217). <b>Stimuliert</b> DHFR Expression (217). <b>Verlängert</b> Lebensspanne von <i>C. elegans</i> (218).
Enalapril	<b>Reduziert</b> Veränderungen mitochondrialer Funktion und Struktur (219). <b>Verlängert</b> Lebensspanne von Ratten (221).
Lisinopril	<b>Reduziert</b> ROS Produktion in Herz und Aorta (213).
<b>ARB</b>	
Candesartan	<b>Inhibiert</b> ROS Produktion, Phosphorylierung von SAPK/JNK, RK1/2, p38MAPK (204), TNF- $\alpha$ induzierte Expression von TGF- $\beta$ , IL-6 (205), mRNA Expression von NOX Untereinheiten (206), Aktivität nicht-endothelialer NOX (217). <b>Vermindert</b> PTX3 und hs-CRP (225). <b>Stimuliert</b> Expression von c-kit (206), DHFR Expression (217).
Losartan	<b>Reduziert</b> Veränderungen mitochondrialer Funktion und Struktur (219). <b>Verbessert</b> oxidativ/antioxidativen Status (212), Dimer/Monomer Verhältnis der renalen eNOS, BH4 Bioverfügbarkeit (216). <b>Verlängert</b> Lebensspanne von Ratten (221). <b>Verschlechtert</b> endothel-abhängige Dilatation unter physiologischen Bedingungen (210).
Telmisartan	<b>Reduziert</b> Superoxid Produktion in Gefäßwand (222), Nitrattoleranz (223).

## Statine

Statine hemmen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterin Synthese, genauer gesagt die Umwandlung von 3-Hydroxy-3methyl-glutarsäure Co-Enzym A (HMG-CoA) zu Mevalonsäure, indem sie die HMG-CoA Reduktase kompetitiv hemmen. Dadurch bewirken sie eine Reduktion der Cholesterin Synthese in Leberzellen und damit indirekt deren verstärkte Expression von LDL-Rezeptoren, wodurch vermehrt LDL-Cholesterin aus

dem Blut aufgenommen werden kann (226). Das erste Statin wurde 1987 unter dem Namen Lovastatin von der FDA zugelassen um atherosklerotische Ereignisse in den Koronararterien vorzubeugen (227). Die Gruppe der Statine ist seit über 30 Jahren fester Bestandteil der medikamentösen Prävention von koronarer Herzkrankheit und Schlaganfällen. Die Hauptwirkung der Medikamente beschränkt sich auf die cholesterinsenkende Komponente, mittlerweile kennt man jedoch unabhängig davon zahlreiche weitere Wirkmechanismen, die sich auf das Endothel, Entzündungsprozesse, kardiale Hypertrophie, Fibrose und ROS auswirken. Man spricht vom pleiotropen Effekt der Statine (228). Neben dem unbestreitbaren Erfolg der Statine in der Behandlung von Hyperlipidämie und der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse, greift die Blockade der HMG-CoA Reduktase auch entscheidend in den Mevalonsäure Signalweg ein und interferiert somit indirekt mit zahlreichen Übergangsprodukten. Die mitochondriale Funktion kann so durch Statine beeinflusst werden, speziell das Coenzym Q10, die Komplexe der Atmungskette und die mitochondriale Apoptose (229). Interessanterweise wirken Statine sich auf die kardiale Mitochondrienfunktion anders aus als auf die Mitochondrienfunktion der Skelettmuskulatur. In der Herzmuskulatur induzieren sie im Sinne einer *Mitohormesis* über die verstärkte ROS Produktion eine verbesserte antioxidative Abwehr, während in der Skelettmuskulatur exzessiver oxidativer Stress eher schädliche Folgen, wie Myopathie, bewirkt (230). Trainierte Skelettmuskulatur scheint allerdings eine höhere antioxidative Kapazität und somit einen besseren Schutz vor den schädlichen Wirkungen der Statine aufzuweisen als untrainierte Muskulatur (231). Wichtig in diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass eine Studie mit 10305 Teilnehmer\*innen, welche 1998 doppelt-verblindet begann und anschließend als offene Studie weitergeführt wurde. Diese ergab, dass Patient\*innen häufiger unerwünschte Muskulatur-assoziierte Events aufwiesen, wenn sie darüber Bescheid wussten, dass sie ein Statin verabreicht bekommen haben. Diese Beobachtung wurde „*Nocebo* Effekt“ genannt (232). Mehrere Mechanismen werden mit den negativen Wirkungen der Statine auf die Skelettmuskulatur in Verbindung gebracht. Die Membran der T-Tubuli der Skelettmuskulatur weist einen hohen Gehalt an Cholesterol auf, eine Reduktion des Cholesterins beeinträchtigt die Kontraktion und den Glukosetransport (233). Statine induzieren eine Erschöpfung gewisser Isoprenoide, was zur Inaktivierung kleiner GTPasen führt, dadurch nehmen sie Einfluss auf Proliferation, Apoptose, Zytoskelettformation und Vesikeltransport in Zellen (234). Außerdem inhibieren Statine, wie in „Tabelle 3: Übersicht Statine“ ersichtlich, die Coenzym Q10 Synthese, einer essenziellen Substanz in der mitochondrialen Atmungskette (235) sowie den Komplex III der Atmungskette (236). Die

Kombination aus Blockade von Cholesterol und Coenzym Q10 Biosynthese vermindert die antioxidative Abwehr und erhöht die Konzentration freier Sauerstoffradikale in der skelettalen Muskulatur (237). Das Entstehen radikaler Sauerstoffspezies und die Anzahl von DNA Fragmentation in Zellkernen erhöhte sich in Proben des *Musculus Deltoideus* bei Patient\*innen mit Statin-induzierter Myopathie. Die antioxidative Kapazität verringerte sich in Atorvastatin-behandelten Ratten, gleichzeitig wurde der mitochondriale Apoptose Signalweg in schnell-glykolytischen Muskelfasern des *Musculus plantaris* aktiviert. Langsam-oxidative Muskelfasern des *Musculus soleus* hingegen zeigten sich resistent gegen den oxidativen Stress. Die Apoptose der schnell-glykolytischen Skelettmuskulatur konnte durch Zugabe des antioxidativ wirksamen Quercetin verhindert werden (238).

In der europäischen Union zählen Schlaganfälle zu den häufigsten natürlichen Todesursachen sowie zu den führenden Ursachen für körperliche Beeinträchtigung im Erwachsenenalter (239). Das Gehirn bietet nur eine schwache Abwehr gegen oxidativen Stress, dieser tritt insbesondere bei ischämischen Prozessen vermehrt auf. Zerebrale Ischämie mit anschließender Reperfusion des Gewebes induziert oxidativen Stress, welcher durch Statine vermindert werden kann. Die Behandlung von Ratten mit Atorvastatin zeigte eine Verbesserung des Verhältnisses von oxidativen zu antioxidativen Substanzen, eine geringere ROS Produktion, eine geringere Apoptose-Rate und eine verbesserte Mitochondrien-Funktion in den Zellen des im Hippocampus lokalisierten *Gyrus Dentatus* (240). Oxidativer Stress beeinträchtigt Nervenzellen in ihrer Funktion, die pleiotrope Wirkung der Statine erwies sich mehrfach als protektiv in neurodegenerativen Erkrankungen, wie Parkinson, Alzheimer oder multipler Sklerose. Die genauen Mechanismen sind teilweise noch unerforscht, zusammenfassend sind die wichtigsten davon aber die Immunmodulation, die Reduktion durch oxidativen Stress induzierten Schäden, antiinflammatorische Eigenschaften und die Verbesserung der Durchblutung von Gewebe. Vielfach hängt die Wirkung von Dosis und Applikationszeitpunkt der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren ab (241). Die Wirkung der Statine ist häufig dosisabhängig, in hohen Dosen aktiviert Simvastatin eher apoptotische Signalwege, während in niedrigen Dosen eher die Autophagie in Zellen angeregt wird. Die Behandlung von aus BMSC differenzierten neuronalen Stammzellen mit Simvastatin (2  $\mu\text{M}$ ) führt zur Aktivierung des antioxidativen Transkriptionsfaktors NRF2, reduziert die ROS-induzierte Autophagie und inhibiert die Apoptose unter Wasserstoffperoxid-induzierten Stressbedingungen (242). Einen wichtigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und Organdysfunktion stellt die Adipositas dar.

Eine fettreiche Diät über den Zeitraum von 20 Wochen provozierte in Ratten signifikante Veränderungen im Metabolismus, der Histologie und der Funktionalität der Nieren. Die hochkalorische Diät führte zu erhöhtem Körpergewicht, einer gestörten Glukosetoleranz, erhöhten Cholesterinwerten, steigenden Triglyzeriden im Plasma und erhöhten Serum-Kreatinin Werten. Der adipöse Zustand ist mit einem metabolischen Ungleichgewicht und oxidativem Stress verbunden, im Tiermodell zeigen adipöse Versuchstiere erhöhte ROS Level und einen Abfall antioxidativer Enzyme. Eine 4-wöchige Therapie mit Atorvastatin in übergewichtigen Ratten zeigte eine Reduktion in renaler Lipidakkumulation, Entzündung, Fibrose, NOX-4- induziertem oxidativen Stress und Apoptose (243). In Leberzellen hingegen scheint Atorvastatin schädigende Effekte über Inflammation, erhöhten oxidativen Stress und Unterdrückung der Apoptose herbeizuführen. Patient\*innen, welche unter *Diabetes mellitus* leiden, bekommen häufig Statine verschrieben, um das kardiovaskuläre Risiko zu senken, dabei kommt es jedoch immer wieder zu leberschädigenden Nebenwirkungen, unter anderem aufgrund einer Störung des oxidativen/antioxidativen Gleichgewichts (244). Generell sind schwere Nebenwirkungen der Statine selten, in einer prospektiven Studie traten bei 1.9%-5.5% der Patient\*innen Statin-induzierte Leberschädigungen auf (245). Interessanterweise zeigt sich jedoch nach gastrointestinaler Ischämie mit anschließender Reperfusion ein hepato-protektiver Effekt durch Atorvastatin. ROS vermittelte Reperfusionsschäden in der Leber scheinen durch die antioxidativen Eigenschaften der Statine vermindert werden zu können (246). Auch bei nicht alkoholischer Steatohepatitis (NASH) gibt es eine klare Reduktion der oxidativen Schäden und verminderten Stress des endoplasmatischen Retikulums im experimentellen Versuch mit Mäusen. Eine eher geringe Dosis Simvastatin (4 mg/kg) zeigte eine deutlich geringere Anzahl an DNA-Schäden in Hepatozyten, vermutlich in starkem Zusammenhang mit der antioxidativen Komponente von Simvastatin. Die Mäuse mit NASH zeigten eine verstärkte Lipidperoxidation mit signifikant erhöhten TBARS, welche durch Applikation des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors gesenkt wurden. Gleichzeitig aktivierte Simvastatin über NRF2 antioxidative Enzyme in den Leberzellen (247). Das endoplasmatische Retikulum als wichtiges Organell der Zelle für die Proteinfaltung ist anfällig für oxidativen Stress und beteiligt an der Entwicklung und dem Fortschreiten einer NASH (248). Zwar sind die genauen Mechanismen unbekannt, aber es konnte ein lindernder Effekt von Simvastatin auf erhöhte Belastung des endoplasmatischen Retikulums gezeigt werden (247). Doch nicht nur die Leber, sondern auch die Nieren profitieren vom antioxidativen Effekt der Statine, bei Reperfusion nach einer ausgedehnten Phase der Minderdurchblutung. Dies spielt vor allem

für die Transplantationsmedizin eine wichtige Rolle (249, 250). Eine hohe Dosis Atorvastatin (40 mg/kg) unterdrückt die Myeloperoxidase Expression und steigert die Glutathion-Peroxidase Aktivität sowie die Katalase Expression in den nach Ischämie wiederdurchbluteten Nieren von Ratten (251). Auch nach Herztransplantation erhöht die Therapie mit Statinen das Gesamtüberleben der Patient\*innen (252). Starke Hypercholesterinämie erhöht oxidativen Stress und trägt so zur Entstehung von Atherosklerose bei. Häufig werden oxidativ modifizierte Proteine als Marker für oxidativen Stress verwendet, diese sind wichtige Bestandteile in der Pathophysiologie der Atherogenese. Atorvastatin verursachte eine signifikante Verminderung der oxidierten Proteincarbonyl-Levels in Herzgewebe und Plasma von Hasen mit Hypercholesterinämie. Malondialdehyd, als Marker für die Lipidperoxidation, und NOX Spiegel im kardialen Gewebe waren ebenfalls erniedrigt. Die Gabe des HMG-CoA Reduktase Inhibitors wirkt durch seine antioxidativen Eigenschaften der Atherogenese entgegen (253). Auch bei moderater Hypercholesterinämie, zeigte Atorvastatin antioxidative und antiatherogene Wirkung, diese verstärkte sich in Kombination mit Probuocol, einem antioxidativ und anti-hyperlipidämisch wirksamen Medikament, und Cilostazol, einem Thrombozytenaggregationshemmer (254). Die Hypercholesterinämie verursacht Cholesterol-induzierte Peroxidationsschäden in der Aorta und im Hippocampus von Hasen. Die chronische Exposition von Hirngewebe gegenüber hohen Levels an Cholesterol scheint Ursache für eine Imbalance zwischen oxidativem Stress und antioxidativen Enzymen zu sein. Die Hämoxygenase-1 (HO-1), zählt zur Gruppe der Hitzeschockproteine und schützt menschliche Zellen vor oxidativen Schäden als Katalysator für die Spaltung von toxischem Häm zu Biliverdin, freiem Eisen und Kohlenstoffmonoxid. Simvastatin steigerte den antioxidativen Status und reduzierte oxidativen Stress im Hippocampus der Versuchstiere, die mRNA Expression der Hämoxygenase-1 in Endothelzellen der Aorta und in Zellen des Hippocampus erhöhte sich signifikant (255). In einer indischen Studie wurden Männer mit *Diabetes mellitus* Typ 2, einem starken Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, über 12 Wochen mit Rosuvastatin (20 mg/Tag) behandelt mit dem Ziel, den Effekt des Wirkstoffes auf HDL-assoziierte Proteine sowie weitere antiatherogene Wirkungen zu messen. Die Intervention führte zu einer signifikanten Reduktion der oxidativen Marker oxLDL, oxHDL und der Myeloperoxidase (MPO), gleichzeitig wurde der Entzündungsmarker TNF- $\alpha$  gesenkt. Zusätzlich erhöhten sich die Paraoxonase-1 Spiegel signifikant, Paraoxonase-1 besitzt die Fähigkeit oxidative Schäden von HDL und LDL zu verhindern (256). Statine reduzieren die chronisch erhöhte Sympathikusaktivität und ROS

Levels in Patient\*innen mit Herzinsuffizienz. Die regelmäßige Gabe von Simvastatin (40 mg/Tag) in einer doppelblinden, placebo-kontrollierten Crossover Studie führte zu einer konstanten Abnahme der muskulären Sympathikusaktivität um 18% begleitet von einer Verminderung der ROS und Superoxidspiegel (257). Der Anstieg an freien Sauerstoffradikalen beim Vorliegen einer Herzinsuffizienz scheint über die verstärkte Expression von AT1-Rezeptoren und NOX verursacht zu werden (258). Die Therapie mit Statinen normalisiert die gesteigerte Sympathikusaktivität in der rostralen ventrolateralen Medulla, der Steuerzentrale des sympathischen Nervensystems, über eine verminderte AT1-Rezeptor und NOX Expression (259). Der antioxidative Effekt von Statinen lässt sich unter anderem auch auf die Fähigkeit die LDL-Spiegel zu vermindern und die HDL-Spiegel zu erhöhen zurückführen. Das HDL kann die Oxidation von LDL zu oxLDL über seine antioxidativen Eigenschaften verhindern. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt das Enzym Paraoxonase-1 (260). In der Radiologie als „white matter hyperintensities“ bezeichnete diffuse Schädigungen der weißen Hirnsubstanz werden mit atherosklerotischen Veränderungen der kleinen Gefäße assoziiert. Eine Studie untersuchte, ob die antioxidativen Effekte von Statinen unterschiedliche Auswirkungen auf Schlaganfallpatient\*innen mit oder ohne Läsionen der *Substantia alba* haben. Während die Statintherapie auf Patient\*innen mit Schäden in der *Substantia alba* bis auf eine Senkung des LDL kaum Auswirkungen hatte, zeigte die Behandlung in Patient\*innen ohne Schäden der *Substantia alba*, zusätzlich zur Senkung des LDL, eine signifikante Steigerung des HDL und der Paraoxonase-1 Aktivität. Das Vorliegen von mit endothelialer Dysfunktion assoziierten Läsionen in der weißen Hirnsubstanz bewirkt demnach ein vergleichsweise schlechteres Ansprechen auf die Statintherapie in Personen nach ischämischem Insult (261). Statine verbessern das Verhältnis von oxidativen zu antioxidativen Substanzen, dadurch reduzieren sie Apoptose, entzündliche Prozesse, während antioxidative Abwehrmechanismen verstärkt werden.

Tabelle 3: Übersicht Statine

<b>Statine</b>	
Atorvastatin	<p><b>Verbessert</b> Verhältnis von oxidativen zu antioxidativen Substanzen, Mitochondriale Funktion (<i>gyrus dentatus</i>) (240).</p> <p><b>Reduziert</b> ROS Produktion, Apoptose-Rate (240), MPO Expression (251), oxidierte Proteincarbonyl Level, MDA, NOX (253).</p> <p><b>Aktiviert</b> Glutathion-Peroxidase, Katalase Expression (251).</p>

	<b>Verschlechtert</b> oxidativ/antioxidatives Gleichgewicht in Leber (244), außer nach Ischämie (246).
Simvastatin	<b>Aktiviert</b> NRF2 (242, 247). <b>Reduziert</b> ROS-induzierte Autophagie, Apoptose (242), Lipidperoxidation in Leberzellen bei NASH (247), ROS (257). <b>Erhöht</b> HO-1 (255).
Rosuvastatin	<b>Reduziert</b> oxLDL, oxHD, MPO, TNF- $\alpha$ (256). <b>Erhöht</b> Paraoxonase-1 (256).

### Thrombozytenaggregationshemmer

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der physiologischen Blutstillung nach Verletzungen der Gefäße (262). Die pathologische Aggregation von Thrombozyten ist hingegen Ursache für arteriell ischämische Ereignisse, wie die koronare Herzkrankheit, Schlaganfall oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Thrombozytenaggregationshemmer sind Standardmedikamente in der Prävention und Therapie von arteriellen thromboembolischen Ereignissen. Ursprünglich wurden hauptsächlich Aspirin und Clopidogrel verwendet, inzwischen gibt es bereits zahlreiche weitere Wirkstoffe, welche in der Klinik angewandt werden, wie Prasugrel, Ticagrelor, Cangrelor und Glycoprotein IIb/IIIa Antagonisten (263). Aspirin entfaltet in Thrombozyten seine Hauptwirkung über die irreversible Blockade des Enzyms Cyclooxygenase-1 (COX1), wodurch indirekt die Produktion von Thromboxan A2 und Prostacyclin gehemmt wird. In höheren Dosen kommt es zur Inhibierung der Cyclooxygenase-2 (COX2) (264). Die oralen Thienopyridine, zu denen Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor gezählt werden, verhindern die Thrombozytenaggregation über eine Blockade des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors einem Chemorezeptor für Adenosindiphosphat (ADP) (264). Die Thrombozytenaggregation in kardiovaskulären Erkrankungen hängt mit eng der Produktion von ROS in verschiedenen Stadien zusammen. Thrombozyten exprimieren NOX1 und NOX2, wobei die NOX1 wichtig für die Thrombozytenaktivierung durch Kollagen und die NOX2 mittels Produktion von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen als Hauptstimulationsfaktor für die Thrombin-abhängige Plättchenaktivierung gilt (265). Bei einem Myokardinfarkt ist die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel aufgrund von lokalem oxidativen Stress und erhöhter Thrombozytenreaktivität verstärkt, infolgedessen werden prothrombotische Mediatoren und ROS von Endothel und Thrombozyten freigesetzt, was zur Vergrößerung der Schäden

beiträgt (266). Zusätzlich zu den NOX Enzymen tragen andere enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse zur Freisetzung von ROS durch Thrombozyten bei (267, 268). Darüber hinaus können die freigesetzten ROS als Second Messenger wirken, indem sie Kalzium mobilisieren, NO inaktivieren und Isoprostane über die Oxidation von Arachidonsäure erzeugen (269). Aspirin zeigte in einer Studie mit humanen Endothelzellen die Fähigkeit die Akkumulation von ROS zu verhindern, indem es die NOX4 Expression hinabreguliert (270). In einer anderen Studie mit Astrozyten senkte Aspirin in niedriger Dosierung inflammatorische Prozesse und steigerte die Expression der Superoxiddismutase 1 und Superoxiddismutase 2 ausgelöst durch das Amyloid  $\beta_{1-42}$  (siehe Tabelle 4: Übersicht Thrombozytenaggregationshemmer) (271). Die duale Therapie mit Aspirin und Clopidogrel ist einer der wichtigsten Eckpfeiler in der Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, nichtdestotrotz treten zu einem gewissen Anteil trotz Therapie rekurrende kardiovaskuläre Ereignisse auf. Man spricht von einer Resistenz gegen Thrombozytenaggregationshemmer (272). Die Aspirinresistenz wird auf Werte zwischen 5% und 75% geschätzt und ist mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität assoziiert (273). In einem systematischen Review wurde ein Prozentsatz von 24,7% für eine labordefinierte Aspirinresistenz bei Männern mit kardiovaskulären Erkrankungen ermittelt (274). Interessanterweise korreliert die Resistenz bei koronarer Herzkrankheit mit einer Erhöhung der oxidativen Stressmarker, jedoch nicht mit der Enzymexpression deren Zielstrukturen (COX) (273). In Patient\*innen mit *Diabetes mellitus* Typ II zeigt die Therapie mit Aspirin verminderte Wirksamkeit, dafür gibt es multiple Gründe. Oxidativer Stress ist maßgeblich an der Entwicklung diabetischer Mikroangiopathie und damit verbundenen kardiovaskulären Ereignissen bei Diabetikern beteiligt. Die erhöhte Belastung durch Sauerstoffradikale ist zumindest teilweise an der geringeren therapeutischen Wirkung von Aspirin in Diabetikern verantwortlich, sie vermindert beispielsweise die Sensitivität der Thrombozyten für die anti-aggregativen Eigenschaften von NO (275). Die Acetyl-Salicylsäure entfaltet seine Wirkung über die Acetylierung eines Serin-Restes im katalytischen Zentrum der Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthase (PGHS) der Cyclooxygenasen und blockiert damit die Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthese. Die Acetylierung wird jedoch von Hydroperoxiden antagonisiert, diese sind Substrate für die PGHS Peroxidase. Die Wirksamkeit von Aspirin ist folglich von der Aktivität der PGHS Peroxidase und der Konzentration von Hydroperoxid-Substraten abhängig (276). Neben den Hydroperoxiden als Aktivatoren der COX scheinen auch Peroxynitrit-Anionen, die aus der Reaktion von NO und Superoxidanionen entspringen, in der Lage zu sein, die COX anzutreiben (277) und der

Acetyl-Salicylsäure entgegenzuwirken (278). Eine Weiterentwicklung des Aspirins ist das NOSH-Aspirin, eine neue Wirkstoffklasse auf Basis der nicht-steroidalen Antirheumatika mit einer zusätzlich NO-freisetzenden und einer Hydrogensulfid (H<sub>2</sub>S)-spendenden Komponente (279). Einer dieser neuen Wirkstoffe wird ZYZ-803 genannt, es zeigte sich, dass in Mäusen mit Isoprenalin-induziertem Herzversagen einer ZYZ-803 Therapie folgend endogene antioxidative Mechanismen hochreguliert wurden. Die Glutathionperoxidase und Hämoxygenase-1 Expression wurden dosisabhängig gesteigert (280). Eine weitere neuentwickelte Form von synthetischem Aspirin trägt den Namen ACS14, es hemmt ebenfalls die Cyclooxygenase und weist zusätzlich antioxidative Eigenschaften auf. Methylglyoxal ist ein chemisch aktiver Metabolit der Einfachzucker Glukose und Fruktose. Die Konzentrationen von Methylglyoxal sind bei Diabetes Typ II erhöht und tragen zur Bildung von Advanced Glycation Endprodukten (AGEs) bei. ACS14 besitzt die Fähigkeit Methylglyoxal-Anstiege zu vermindern und dadurch oxidativen Stress, vor allem Peroxynitrid, zu reduzieren. Die NOX4 Expression in vaskulären glatten Muskelzellen wurde durch ACS14 signifikant reduziert (281). Nicht steroidale Antirheumatika, wie Acetylsalicylsäure, besitzen durch ihre COX inhibitorische Wirkung anti-thrombotische, antiinflammatorische und analgetische Eigenschaften. Die Kehrseite dieser Wirkungen sind jedoch nachteilige Effekte wie ein erhöhtes Risiko für gastrointestinale Erosionen, Ulzera bis hin zu Blutungen (282). ACS14 zeigt in der gleichen Dosierung wie Aspirin hingegen kein erhöhtes Risiko für Schädigungen der Magenschleimhaut von Ratten auf. Tatsächlich verhinderte ACS14 sogar einen Aspirin-induzierten Anstieg an Malondialdehyd und erhöhte signifikant die gastrischen GSH Spiegel. Darüber hinaus wurde die durch Aspirin gesenkte Superoxiddismutase Expression durch ACS14 umgekehrt (283). Die Xanthinoxidase, ein wichtiges Enzym im Stoffwechsel der Purinbasen der DNA, katalysiert die Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure. In diesem Prozess fallen auch Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid an (284). Aspirin erhöhte Xanthinoxidase Protein Levels im Magengewebe, was durch ACS14 verhindert wurde. Das H<sub>2</sub>S freisetzende ACS14 schützt also die Magenschleimhaut vor Aspirin-induzierten Schäden über antioxidative Mechanismen (283). Die Artherosklerose ist eine Erkrankung der Intima von mittleren und großen Gefäßen. Sie wird verursacht durch endotheliale Dysfunktion und entzündliche Prozesse, welche zur Ablagerung von Lipiden, Cholesterol und Kalzium führen (285). Thrombozyten tragen wesentlich zur Pathophysiologie der Atherosklerose bei, die Aktivierung der Blutplättchen bewirkt unter anderem eine Aktivierung der NOX und Freisetzung von Superoxidanionen, welche wiederum zur Rekrutierung weiterer

Thrombozyten und Formation eines Thrombus führen (286). Neben der Senkung Atherosklerose-assoziiierter Entzündungsmarker, reduzierte Clopidogrel die Lipiperoxidation und erhöhte GSH Levels in der Aorta von Hasen, welche mit einer cholesterinreichen Diät ernährt wurden. Das Fortschreiten atherosklerotischer Prozesse wurde dadurch erfolgreich eingedämmt (287). In einer randomisierten, placebo-kontrollierten Studie wurde die Wirkung von Clopidogrel auf Patient\*innen mit stabiler symptomatischer koronarer Herzkrankheit und chronischer Einnahme von Acetylsalicylsäure untersucht. Die zusätzliche Therapie der Patient\*innen mit Clopidogrel wirkte antiinflammatorisch, verbesserte die endotheliale Funktion und NO Bioverfügbarkeit und reduzierte die 8-iso-Prostaglandin F2 $\alpha$  Exkretion im Harn, einem *in vivo* Marker für oxidativen Stress. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Clopidogrel seine Wirkung in gefäßgeschädigten Patient\*innen nicht nur über anti-aggregatorische Eigenschaften entfaltet, auch antiinflammatorische und antioxidative Komponenten spielen eine Rolle (288). Die Therapie mit Ticagrelor, einem reversiblen, oralen P2Y12 Rezeptor Antagonisten, zeigte bei Patient\*innen mit akutem Koronarsyndrom ein besseres Outcome als die Therapie mit Clopidogrel (289). Der Vorteil von Ticagrelor ist, dass es zusätzlich zu seinem Thrombozytenaggregations-inhibitorischen Effekt, die Fähigkeit besitzt die Adenosin-Resorption in infarziertem Gewebe des Myokards zu verhindern. Dies schützt das Herz vor Reperfusionsschäden und verringert die Größe des Infarktareals (290, 291). Die anhaltende Dysfunktion des Myokards nach ischämischen oder hypoxischen Ereignissen wird als „myocardial stunning“ bezeichnet, ROS scheinen eine ursächliche Rolle dafür einzunehmen. Die Aktivierung von Adenosin A1 Rezeptoren vor einer Ischämie oder Hypoxie des Myokards mildert die nachfolgende Dysfunktion des Gewebes über eine Reduktion der ROS Formation (292). Eine Aktivierung der Adenosin A2 Rezeptoren verhindern darüber hinaus Reperfusionsschäden über ein Verhindern von Ansammlungen neutrophiler Granulozyten und die damit verbundene Superoxid-Anionproduktion (293). Thrombozytenaggregationshemmer verhindern teilweise die ROS Freisetzung und oxidative DNA Schäden, während die Expression antioxidativer Enzyme gesteigert wird.

*Tabelle 4: Übersicht Thrombozytenaggregationshemmer*

<b>Thrombozyten-aggregationshemmer</b>	
Aspirin	<b>Vermindert</b> NOX4 Expression (270). <b>Steigert</b> SOD1 und SOD2 (271).
ZYZ-803	<b>Steigert</b> Expression von Glutathionperoxidase und HO-1 (280).

ACS14	<b>Vermindert</b> Anstieg von Methyglyoxal und Peroxynitrid (281), Aspirin-induzierten MDA Anstieg, Aspirin-induzierten Xanthinoxidase Anstieg (283). <b>Erhöht</b> gastrische GSH Spiegel, SOD Expression (283).
Clopidogrel	<b>Reduziert</b> aortale Lipidperoxidation (287), 8-iso-Prostaglandin F2 $\alpha$ Exkretion (288). <b>Erhöht</b> aortale GSH Levels (287), NO Bioverfügbarkeit (288).
Ticagrelor	<b>Verhindert</b> Adenosin-Resorption in infarziertem Myokard (290, 291).

### Orale Antidiabetika - Metformin

Das Biguanid-Derivat Metformin ist global gesehen eines der meistverwendeten Medikamente in der Therapie von *Diabetes mellitus* Typ II. Ab den 1920er Jahren wurden erstmalig keine stark toxischen Extrakte der Heilpflanze *Galega officinalis* synthetisiert, um *Diabetes mellitus* zu behandeln, 1958 wurde Metformin in Großbritannien und anderen europäischen Staaten verfügbar gemacht (294, 295). 60 Jahre später wird der Wirkstoff sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit anderen glukosesenkenden Wirkstoffen empfohlen (296). Metformin verursacht eine Senkung der Glukose-Produktion über die Leber und regt den Glukoseverbrauch sowie die Bildung von Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1) im Darm an. Die therapeutischen Effekte des Medikaments beruhen auf der Inhibierung des Komplex I der Atmungskette in hepatischen Mitochondrien, dies führt über ein ATP (Adenosintriphosphat) Defizit zur Aktivierung der Adenosinmonophosphat-abhängigen Kinase (AMPK) und damit verbunden zu einer erhöhten Sensitivität für Insulin. Zusätzlich senkt das Biguanid zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und die Expression von Enzymen der Gluconeogenese (297). Seit einigen Jahren vermutet man hinter den Effekten von Metformin auch lebensverlängernde Wirkungen, Grund dafür ist die Aktivierung der AMPK, welche als Regulator zahlreicher Signalwege Einfluss auf die Gesundheit und Lebensspanne von Organismen nehmen kann (298, 299). Über mTOR und ULK1 kontrolliert die AMPK die Autophagie, durch die Stimulation von FOXO/DAF-16, NRF2/SKN-1, and SIRT1 Signalwegen beeinflusst sie die zelluläre Stressresistenz (299). Auf der Suche nach alters-assoziierten Genen und Signalwegen stieß man unter anderem auf das Wachstumshormon IGF1, welches über den PI3K/AKT/mTOR Signalweg reguliert wird

(300). IGF1 wird von Metformin über die Aktivierung der AMPK und dem inhibitorischen Effekt auf den mTOR Signalweg beeinflusst (300). Über die Simulation eines katabolen Zustandes aktiviert Metformin die AMPK, welche wiederum die mitochondriale Atmungskette aktiviert. Zwar inhibiert Metformin den Komplex I der Atmungskette, allerdings auf eine andere Art und Weise wie z.B. Rotenon, denn Metformin bewirkt eine verstärkte ROS Bildung, während Rotenon diese vermindert (301). Der Unterschied dabei scheint zu sein, dass Rotenon eine Elektronenzufuhr über Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid (NADH) zum Komplex I verhindert, während bei Metformin dem Komplex I immer noch genügend Elektronen über NADH zugeführt werden, um ROS zu bilden. Diese gebildeten ROS werden in Zusammenhang mit der *Mitohormesis* und lebensverlängernden Effekten bei *C. elegans* gebracht. Peroxiredoxin 2 scheint in der Vermittlung der ROS und den lebensverlängernden Prozessen ein Schlüsselmolekül zu sein (301). Erwähnenswert ist, dass die AMPK Aktivität im Alter abnimmt, die Hoffnung das Altern über die exogene AMPK Aktivierung zu verzögern, ist einer der Gründe für die genauere Betrachtung von Metformin (299). *In vivo* sind die lebensverlängernden Effekte des Biguanids trotzdem kontrovers. Einerseits konnte bei Mäusen, Ratten, Fischen und dem Modellorganismus *C. elegans* eine Verlängerung der Lebensspanne und der „Gesundheitsspanne“, welche über die Schwimmkraft der Würmer beurteilt wurde, beobachtet werden. Dazu sei jedoch gesagt, dass die verlängerte Lebensspanne bei den Ratten nicht signifikant war. Verantwortlich für die Wirkung wird unter anderem die Fähigkeit von Metformin gemacht den Zustand einer Kalorienrestriktion zu imitieren (301-305). Andererseits konnte bei Mäusen und *Drosophila melanogaster* keine Verlängerung der Lebensspanne beobachtet werden (306, 307). Bei den Mäusen ist vermutlich der Applikationszeitpunkt von Metformin ein wichtiger Faktor für den lebensverlängernden Effekt, der Beginn der Applikation in höherem Lebensalter zeigt keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe (307). Bei Therapiebeginn in jungem Alter von Mäusen zeigten sich jedoch sehr wohl positive Effekte auf die Lebensspanne. Zusätzlich verlängerte sich durch die Biguanid-Gabe auch die „tumorfremde Lebenszeit“ der Mäuse, Tumore wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe erst später detektiert (308). Einen wesentlichen Anteil an der Regulation kardiovaskulärer Prozesse nimmt das Endothel ein, für eine adäquat funktionierende, Acetylcholin-medierte Vasodilatation muss dieses allerdings unbeschädigt sein. Eine verminderte vasodilatatorische Antwort des Endothels auf Acetylcholin spricht für eine beginnende kardiovaskuläre Erkrankung (309). Die protektive Wirkung von Metformin auf die endotheliale Funktion wird gestützt von einer Bandbreite an Literatur (310). Um die

Wirkung von Metformin auf geschädigtes Endothel zu bewerten wurden Patient\*innen mit *Diabetes mellitus* Typ II für 12 Wochen entweder mit Metformin (500mg, 2x tägl.) oder einem Placebo behandelt. Zu Beginn und nach Ende der 12-wöchigen Behandlung wurden endothelabhängige Vasodilatoren (Acetylcholin), endothelunabhängige Vasodilatoren (Nitroprussid) sowie der nitratenabhängige Vasodilatator Verapamil verabreicht. Mittels Unterarm-Plethysmografie wurde anschließend der Blutfluss gemessen und die Reaktionen der Arterie auf die verschiedenen Vasodilatoren gegenübergestellt. Verglichen mit dem Placebo verbesserte Metformin die endothelabhängige Vasodilatation, nicht jedoch die endothelunabhängige Vasodilatation. Die Resultate implizieren, dass die Störungen im Blutfluss durch eine endotheliale Dysfunktion hervorgerufen werden, welche durch Metformin verhindert werden können (311). Unterstützt werden diese Ergebnisse von einer weiteren randomisierten, placebo-kontrollierten Studie, welche Änderungen von Biomarkern in Zusammenhang mit der endothelialen Funktion bei 390 Patient\*innen mit Typ II Diabetes im Verlauf von 52 Monaten untersuchte. Die Langzeittherapie mit Metformin bewirkte, teilweise unabhängig von Änderungen des Hämoglobin A1c (HbA1c) Wertes, eine Verbesserung der Biomarker für endotheliale Dysfunktion, wie dem von Willebrand Faktor (vWF), dem soluble Vascular Adhesion Molekül-1 (sVCAM-1), dem Tissue Type Plasminogen Aktivator (t-PA) und dem Plasminogen Aktivator inhibitor-1 (PAI-1). Die Autoren schließen daraus auf eine direkte Wirkung von Metformin auf die endotheliale Funktion, teilweise unabhängig von der glukosesenkenden Wirkung des Medikamentes (312). In Zellkulturen wurden der Komplex I und Komplex III der Atmungskette in endothelialen Mitochondrien bei hohen Konzentrationen von Metformin (500 µM) gehemmt, nicht jedoch bei niedrigen Konzentrationen (10 µM). Trotz der nicht-inhibitorischen Wirkung von 10 µM Metformin auf den Komplex I war die geringe Wirkstoffkonzentration in der Lage, die AMPK in Endothelzellen zu aktivieren. Metformin kann die AMPK also in hohen und in niedrigen Dosen, unabhängig von der Inhibierung des Komplex I, aktivieren (313). Interessanterweise war der Wirkstoff aber nur in niedrigen Konzentrationen in der Lage eine Hyperglykämie-induzierte Endotheldysfunktion wieder umzukehren. Demnach konnte keine direkte Verbindung zwischen der AMPK Aktivierung und dem Schutz der endothelialen Funktion vor Hyperglykämie-induzierten Schäden durch Metformin hergestellt werden (313). Vielmehr scheint der Nuclear Rezeptor 4A1 (NR4A1/Nur77) für die schützende Funktion vor Hyperglykämie-induzierter Endotheldysfunktion essenziell zu sein. Es zeigte sich *in vitro* und *in vivo*, dass Metformin das Endothel über die Minimierung von oxidativem Stress schützt und der NR4A1 dabei

eine wichtige Rolle einnimmt, denn die Vorteile wurden in Endothelzellen ohne den NR4A1 nicht nachgewiesen (313, 314). Diabetes und Hyperglykämie verursachen über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies Endothelschäden (315). Die Hyperglykämie verursacht in Endothelzellen eine vermehrte Spaltung von Mitochondrien, oxidativen Stress und eine Verschlechterung der endothelialen Funktion. Metformin vermindert diese Auswirkungen über die Aktivierung der AMPK, welche die Expression des dynamin-related Proteins (Drp1) mindert und so die mitochondriale Fragmentation verhindert (316, 317). Die Freisetzung von ROS durch Glukose (25 mM) konnte durch die Zugabe von Metformin (50  $\mu$ M) unterdrückt werden. Dieser Effekt trat nicht auf, wenn ein NR4A1 Antagonist beigefügt wurde (313). Die Erzeugung von ROS wird von Metformin über verschiedene Mechanismen eingedämmt. Es gibt Studien, welche zeigen, dass Metformin ROS Levels über eine Inhibierung der NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase des Komplex I verringert (318), andere besagen eine Reduktion erhöhter ROS Produktion durch eine intrazelluläre Inhibierung der Protein Kinase C Aktivität (319). Zusätzlich zur Inhibierung der Atmungskette gibt es Anzeichen, dass Metformin die Formierung reaktiver Sauerstoffspezies zumindest auch teilweise über die Blockade der NADPH Oxidase verhindert. In bovinen Endothelzellen konnte oxidativer Stress, induziert durch hohe Glukose Konzentrationen oder Angiotensin II, unterdrückt werden (320). Eine chronische Hyperglykämie verursacht eine Translokation der  $\beta$ 2 Isoform der Proteinkinase C (PKC- $\beta$ 2) aus dem Zytosol in die Zellmembran. Die PKC scheint oxidativen Stress über die Phosphorylierung einer NOX Untereinheit (p47phox) zu induzieren (321). In humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (Nabelschnurendothelzellen) konnte gezeigt werden, dass Metformin die Translokation der PKC- $\beta$ 2 über direkt antioxidative Mechanismen hemmt. Die Aktivität der Katalase, welche Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandelt, wird stimuliert und die NOX der Plasmamembran gehemmt (322). Metformin schützt auch vor den Folgen von oxidativem Stress. Die Hyperglykämie und Bluthochdruck verursachen ein Ungleichgewicht von oxidativem Stress und antioxidativer Abwehr, welches zur Aktivierung der Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) führt. Eine zu starke Aktivierung der PARP1 fördert proinflammatorische Prozesse, Nekrose und zelluläre Dysfunktion, dies provoziert beispielsweise die Atherogenese (323). Biguanide und auch der AT1 Rezeptor Blocker Telmisartan mindern endotheliale Dysfunktion über die Einschränkung der PARP1 Aktivität (324). Bei Ratten mit Hypertonie erwies sich eine Metformintherapie (300 mg/kg) über 30 Tage als vorteilhaft hinsichtlich inflammatorischer und oxidativer Marker, und zwar unabhängig von dessen Effekt auf den Blutglukosespiegel (325). Durch die Behandlung mit

Metformin konnten sowohl die NOX2 als auch die COX2 Expression gesenkt werden. Die beiden Werte korrelierten positiv miteinander, was darauf hindeutet, dass oxidativer Stress und Entzündung miteinander assoziiert sind. Die Superoxiddismutase 1 und die Superoxiddismutase 2 hingegen blieben vom Wirkstoff unbeeinflusst (325). Übergewicht und endotheliale Dysfunktion sind wesentlicher Bestandteil altersassoziierter kardiovaskulärer Erkrankungen (326). Bezeichnend für das Altern ist auch ein unvermeidbarer physiologischer Prozess, nämlich die Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit. Der Hippocampus, allgemein bekannt für seine Beteiligung an der Gedächtnisbildung, ist im Alter von neurobiologischen Veränderungen betroffen. Oxidativer Stress, inflammatorische Prozesse, Abnahme der Neurogenese und Plastizität der Synapsen werden mit dem Verfall der kognitiven Fähigkeiten im Alter assoziiert (327). Die Langzeittherapie mit Metformin nimmt bei nicht-diabetischen Ratten Einfluss auf diesen Verfall. Im Verlauf von sechs Monaten wiesen mit Metformin behandelte Ratten eine signifikant höhere totale antioxidative Kapazität und deutlich geringere MDA Spiegel auf als die Kontrollgruppe, gleichzeitig war der relative Anteil apoptotischer hippocampaler Neuronen signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe (328). Es konnte gezeigt werden, dass sich altersabhängige Schäden des Hippocampus durch Sauerstoffradikale durch die Gabe von Metformin verringern und sich dies positiv auf die kognitive Funktion von Ratten auswirkt (328). Eine Übersicht zu den genannten Effekten findet sich in „Tabelle 5: Übersicht orale Antidiabetika“. Metformin besitzt das Potential die Lebenszeit von Modellorganismen über mitohormetische Prozesse zu erhöhen und teilweise unabhängig von seiner glukosesenkenden Wirkung die endotheliale Funktion zu verbessern.

*Tabelle 5: Übersicht orale Antidiabetika*

<b>Orale Antidiabetika</b>	
Metformin	<p><b>Steigert</b> Lebenserwartung und tumorfreie Lebenszeit bei Mäusen (308).</p> <p><b>Verbessert</b> endothelabhängige Vasodilatation (311).</p> <p><b>Aktiviert</b> die AMPK (313).</p> <p><b>Inhibiert</b> NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase (318), Protein Kinase C (319), NOX (320, 322) und PARP1 Aktivität (324).</p> <p><b>Erhöht</b> totale antioxidative Kapazität (328).</p>

## **Vitamine (A, C, E)**

Vitamine sind lebenswichtige Mikronährstoffe, die üblicherweise über die Nahrung zugeführt werden müssen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen wasserlöslichen Vitaminen (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, C, H) (329) und fettlöslichen Vitaminen (A, D, E, K) (330). Die Vitamine erfüllen wichtige Aufgaben im Stoffwechsel und sind essenziell für die physiologische Zellfunktion, Embryonalentwicklung und das Wachstum (331-333), darüber hinaus besitzen die Vitamine A, C und E zusätzlich antioxidative Eigenschaften (334, 335). Paradoxe Weise besitzen diese Vitamine unter speziellen Bedingungen auch pro-oxidative Eigenschaften (336-339). Unter dem Begriff Vitamin A fasst man üblicherweise verestertes Retinol und Provitamin A-Carotinoide zusammen, es wird in der Leber gespeichert und ist essenziell für die Erhaltung der Integrität aller Körperoberflächen (340). Carotinoide werden in Pflanzen synthetisiert (341) und besitzen blutdrucksenkende sowie antiinflammatorische Eigenschaften, welche sie interessant für die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen machen (342). Auch bei anderen chronisch degenerativen Erkrankungen, wie Tumorerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen, senken Carotinoide über antioxidative und ROS-modulierende Mechanismen proinflammatorische Mediatoren als auch die NF- $\kappa$ B Aktivierung. Darüber hinaus können sie durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Expression antioxidativer und zytoprotektiver Enzyme stimulieren (343). Das Carotinoid Lycopin schützt beispielsweise vor ROS-induzierter kardialer Hypertrophie (344) sowie Reperfusionsschäden des Myokards über Senkung von Stress auf das endoplasmatische Retikulum, vermindert die Produktion von ROS und verbessert die AMPK Aktivität (345). Es konnte auch gezeigt werden, dass Lycopin die Endothelfunktion in Patient\*innen mit kardiovaskulären Erkrankungen verbessert, nicht jedoch bei gesunden Individuen (346). Für die antiatherogenen Effekte von Lycopin werden die schützende Wirkung vor endothelialen Schädigungen, die Inhibierung der Cholesterolsynthese über eine Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase Aktivität, das Verhindern der Oxidation von LDL, eine verbesserte HDL Funktion, die Unterdrückung proinflammatorischer Aktivität durch Makrophagen und T-Lymphozyten, das Verhindern der Schaumzellbildung und die verminderte Proliferation glatter Muskelzellen verantwortlich gemacht (347, 348). Eine wichtige Untergruppe der Carotinoide, die in menschlichem Plasma nachgewiesen werden können, stellt das  $\beta$ -Carotin dar (349). Unter pathologischen Bedingungen können Abkömmlinge des  $\beta$ -Carotins negative Auswirkungen auf die Gesundheit erkrankter Personen haben. In einer randomisierten, doppelblinden Studie

wurden 18314 Raucher, ehemalige Raucher und Asbest-exponierte Arbeiter eingeschlossen. Den Proband\*innen wurden eine Kombination von 30 mg  $\beta$ -Carotin und 25000 IU Retinol pro Tag verabreicht. Nach ungefähr 4 Jahren der Supplementation wurde die Studie frühzeitig beendet, da sich auf das Risiko für den Tod durch Lungenkrebs und kardiovaskulärer Erkrankungen kein Benefit und im Follow-Up sogar nachteilige Effekte feststellen ließen (350). Dies bestätigte die zuvor durchgeführte ATBC Studie, in welcher 29133 männlichen Rauchern entweder 20 mg  $\beta$ -Carotin und/oder 50 mg  $\alpha$ -Tocopherol verabreicht wurden. Nach 3 Jahren stellte man in der  $\beta$ -Carotin Gruppe ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs, Myokardinfarkt sowie eine um 8% erhöhte Mortalität fest (351).

Vitamin C, auch bekannt als Ascorbinsäure, ist vor allem bekannt für seine Funktion in der Kollagensynthese. Seine Aufgabe besteht darin, bei inaktiven Enzymen den Cofaktor  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  zu reduzieren und damit zu reaktivieren (352). Ein Mangel des Vitamins führt zu einer insuffizienten Kollagensynthese bis hin zu Skorbut. Die Ascorbinsäure gilt als sehr potentes wasserlösliches Antioxidans und vermittelt seine antioxidative Tätigkeit über die nicht-enzymatische Reduktion von Sauerstoffradikalen (353, 354). Paradoxerweise kann Vitamin C, ähnlich den Carotinoiden, pro-oxidative Wirkung zeigen, indem es  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Dies führt wiederum zu einem Anstieg von Hydroxylradikalen (355). Während das Vitamin in gesunden Personen üblicherweise in physiologischem Ausmaß vorhanden ist, beobachtet man in kritisch kranken Personen häufig einen Mangel (356). Bei einer Studie mit 40 septischen Patient\*innen wurde bei 68% eine Hypovitaminose C ( $< 23 \mu\text{mol/L}$ ) festgestellt. Mit einer Hypervitaminose C bei 88% war dieser Unterschied noch deutlicher in Patient\*innen mit septischem Schock (357). Septische Patient\*innen bedürfen durch die Inflammation und den damit verbundenen erhöhten Verbrauch an Vitamin C einer deutlich höheren Einnahme als standardmäßig enteral oder parenteral zugeführt wird (100 – 200 mg/Tag) (357). Der akute Abfall an Vitamin C Levels in kritisch kranken Personen hängt sehr wahrscheinlich mit dem erhöhten metabolischen Verbrauch, der verminderten Wiederverwertung von oxidiertem Vitamin C und dem aus Entzündungskaskaden entstehenden oxidativen Stress zusammen (358, 359). In einer vorklinischen Studie wurde Mäusen nach induziertem Myokardinfarkt und der anschließend erfolgreichen Wiederbelebung venös Vitamin C (100 mg/kg) verabreicht, dies resultierte in einer geringeren Lipidperoxidation im Myokard, einer besseren systolischen Funktion und Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (360). Bei Patient\*innen mit chronischem Herzversagen wurde gezeigt, dass Vitamin C Marker für erhöhten oxidativen Stress

(TBARS) sowie Zeichen für die Apoptose von Endothelzellen deutlich senkte. Die Autoren vermuten, dass Vitamin C über eine Erhöhung des bioaktiven intrazellulären NO die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und damit die Einleitung der Apoptose von Endothelzellen verhindert (361). Vitamin C zeigt antioxidative Wirkungen auf Gewebe unter pathologischen Bedingungen, aber auch auf das Altern scheint die Ascorbinsäure positiv Einfluss zu nehmen. *C. elegans* mit einer Mutation im *bus-8* Gen, welche die Permeabilität der Würmer für exogene Substanzen erhöht, wiesen bei Kontakt mit Vitamin C (5 mM) eine signifikant längere Lebensspanne auf. Der Effekt war bei höherer Vitamin C Konzentration (10 mM) zwar nicht so stark ausgeprägt, dennoch signifikant (362). Im Mausmodell untersuchte man die Wirkung von Vitamin C auf oxidative Schäden in Leber und Herz anhand des Werner Syndroms, einer genetisch bedingten Erbkrankheit, welche vorzeitiges Altern verursacht. Im Zuge der Behandlung mit dem Vitamin verringerten sich einerseits die ROS Levels in den Tieren, andererseits verbesserten sich oxidative DNA-Schäden im Gewebe der besagten Organe (363).

Ein weiteres Vitamin mit antioxidativen Eigenschaften stellt das Vitamin E, auch weitestgehend unter dem Namen Tocopherol bekannt, dar. Bei Vitamin E handelt es sich genau genommen um einen Sammelbegriff für eine Gruppe fettlöslicher Verbindungen mit ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften (364). Man fasst dabei alle Formen von Tocopherolen, Tocotrienolen und deren Abkömmlinge zusammen, wobei  $\alpha$ -Tocopherol die häufigste Form darstellt. Pflanzliche Öle, Nüsse, Früchte und Gemüse zählen zu den wichtigsten natürlichen Quellen für das Vitamin (365). Über die Nahrung aufgenommenes Vitamin E hat bis zu einem gewissen Grad Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Tumorentstehung und Gesamtmortalität (366). Der Effekt von Vitamin E auf kognitive Leistungsfähigkeit und die präventive Wirkung auf eine Alzheimer Erkrankung ist umstritten, da die Ergebnisse in Studien dazu sehr unterschiedlich sind. Eine *in vitro* Studie zu Alzheimer konnte zeigen, dass  $\alpha$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocopherol mitochondriale ROS und Beta-Amyloid (A $\beta$ 42) in Neuronen vermindern (367). In einer Studie von 1993 bis 2002 mit Patient\*innen über 65 stellte man einen protektiven Effekt von Tocopherolen gegenüber Alzheimer fest (368). Die Kohortenstudie mit Frauen über 70 ergab, dass jene mit Einnahme von Vitamin E oder einer in Kombination aus Vitamin E und Vitamin C eine insgesamt bessere kognitive Leistungsfähigkeit aufweisen als Personen, die diese Supplemente nicht einnahmen (369). In einer kleinen randomisierten, doppelblinden Studie bewirkte die tägliche Supplementation von Vitamin E in Kombination mit  $\omega$ -3-Fettsäuren und

Carotinoiden über den Verlauf von 24 Monaten in gesunden über 65-Jährigen zwar eine verbesserte Gedächtnisleistung gegenüber der Placebogruppe, verantwortlich für den Effekt wurden aber die Carotinoide und die  $\omega$ -3-Fettsäuren und nicht das Vitamin E gemacht (370). Eine weitere Studie, die als randomisierte, doppelblinde Studie startete und nach 7 Jahren in eine Kohortenstudie geändert wurde, ergab keinen präventiven Effekt auf Demenz durch die Supplementation von Vitamin E (371). Die Studie war einer größeren Studie untergeordnet (SELECT Studie), welche den Effekt von Vitamin E und Selen auf das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken untersuchte. Diese ergab, dass beide Stoffe keinen präventiven Effekt auf die Inzidenz von Prostatakarzinomen aufwiesen. Die Resultate zeigten einen nicht signifikanten Anstieg der Inzidenz von Prostatakarzinomen in der Vitamin E Gruppe gegenüber der Placebogruppe (372).

## **Diskussion und Fazit**

Der Bedarf an neuen therapeutischen Strategien für altersassoziierte Erkrankungen beschäftigt die Forschung in zahlreichen und auf den ersten Blick voneinander unabhängigen Bereichen der Medizin. Die ROS-Modulation erscheint als ein vielversprechendes Mittel in der Lösung dieses Problems. Die Zulassung neuer Stoffe vom Zeitpunkt der Entdeckung bis hin zur Verwendung am Menschen nimmt in der Regel sehr viel Zeit in Anspruch. Deshalb ist es sinnvoll sich nicht nur darauf zu konzentrieren, sondern gleichzeitig Stoffe mit gutem Sicherheitsprofil zu untersuchen, welche sich bereits seit Jahrzehnten bewährt haben. Carvedilol erweist sich unter anderem aufgrund seiner direkt antioxidativen Eigenschaften in vielerlei Hinsicht als vorteilhaft gegenüber anderen Beta-Blockern (164, 187, 193-195). Dafür verantwortlich ist unter anderem die Inhibierung der MPT. Unter der MPT versteht man eine Erhöhung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran in Folge von Kalziumakkumulation und oxidativem Stress, häufig nach kardialer Ischämie und Reperfusion (165, 184). Kurze, kontrollierte und reversible Öffnungen der MPT Poren könnten durch das Freisetzen von ROS und Kalziumionen eine physiologische Rolle in der mitochondrialen Homöostase spielen (117). Die erhöhte Aktivität der Poren im Alter wirkt sich jedoch negativ auf die Autophagozytose der Mitochondrien aus und trägt zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen bei (50). Weiters senkt Carvedilol unter pathologischen Bedingungen den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (168) und stellt das verminderte MMP wieder her (169, 170). Dysfunktionale Mitochondrien stellen eine der Hauptquellen für ROS dar, diese reagieren mit der DNA, Proteinen sowie Lipiden,

induzieren pathologische Zustände und zählen daher zu den wichtigsten Ursachen für das Altern (51, 373). Gleichzeitig verringert Carvedilol *in vivo* und *in vitro* die Apoptose (170, 172, 173, 179, 180, 183, 192) und erhöht antioxidative Abwehrmechanismen (170, 172, 177, 178, 180-182, 192). Trotz der vielversprechenden präklinischen Studien gibt es nur vereinzelt kleinere klinische Studien mit zahlreichen Limitationen zu den antioxidativen Eigenschaften des Carvedilols. Die untersuchten Patient\*innen wiesen alle bereits eine zu behandelnde Grunderkrankung auf, weshalb sich über den Effekt des Medikaments im Sinne einer Primärprävention keine Aussage machen lässt. Der Einsatz von Carvedilol als Mittel für eine Sekundärprävention oder Tertiärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen erwies sich, neben der Wirkung auf die Adrenorezeptoren, aufgrund seiner pleiotropen und antioxidativen Effekte mehrfach als vorteilhaft (187, 188, 190, 194-197). Erwähnenswert ist, dass die antioxidativen Fähigkeiten von Carvedilol offenbar hauptsächlich durch das (S)-Enantiomer des Wirkstoffes vermittelt werden (170).

ACE-Inhibitoren und AT-1 Rezeptorblocker zeigen vielversprechende antioxidative Mechanismen in vorklinischen Untersuchungen. So verhindern sie indirekt die Freisetzung von ROS durch die NOX, wodurch weniger aktivierendes Glutamat im Nucleus Intermediolateralis ausgeschüttet wird (204), reduzieren TNF- $\alpha$  im Nierengewebe (205), erhöhen die Bioverfügbarkeit von BH4 (216, 217, 223) und verhindern die Expression von NOX Untereinheiten in Aorta, Herz und der Nierenrinde. Zusätzlich scheint Candesartan die kardiale c-kit Expression zu erhöhen, welche mit Reparatur, Erneuerung und Remodeling nach Myokardinfarkt in Verbindung gebracht wird (206). Die protektiven Mechanismen der ACE Inhibitoren und AT1-Rezeptor Antagonisten auf Herz und Gefäße spiegelten sich in einer erhöhten Lebensspanne von gesunden Ratten wider (221). Auch die Lebensspanne von *C. elegans* konnte durch ein ACE-Inhibitor-Äquivalent erhöht werden (218). Mit einer generellen Empfehlung für die Verwendung der Medikamente an gesunden Versuchsobjekten sollte man trotzdem zurückhaltend sein, da in einer aktuelleren Studie an gesunden Ratten gezeigt wurde, dass die Blockade des AT1-Rezeptors die endothelabhängige Dilatation und die NO Produktion in den mittleren Zerebralarterien vermindert und gleichzeitig den vaskulären und systemischen oxidativen Stress erhöht (210). Die vorklinischen Erkenntnisse bezogen auf die ROS-modulierenden und lebensverlängernden Effekte von ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor Antagonisten sprechen für deren hohes Potential in der Sekundärprävention kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen, dies bestätigt sich auch in einer klinischen Studie mit adipösen,

hypertensiven Patient\*innen (224). Vor allem die AT-1 Rezeptorblocker zeigen vergleichsweise hochpotente vasoprotektive Eigenschaften (225), um genauere Aussagen über ROS-modulierende Effekte auf das kardiovaskuläre System beim Menschen zu treffen, sind jedoch eine höhere Anzahl klinischer Studien mit größeren Studienpopulationen und längeren Beobachtungszeiträumen notwendig.

Die Statine gestalten sich in ihrer pleiotropen Wirkung als ein zweischneidiges Schwert, die positiven Effekte sind sehr situations- und gewebeabhängig, was ihren Einsatz nicht ausnahmslos sinnvoll erscheinen lässt. Während sich die Anwendung von Statinen über *mitohormetische* Prozesse positiv auf die Funktion der Herzmuskulatur auswirkt, bewirkt sie in der Skelettmuskulatur das genaue Gegenteil (230), wobei trainierte Skelettmuskulatur besser vor den negativen Auswirkungen geschützt sein zu scheint als untrainierte (231). Spannend in diesem Zusammenhang ist der „*Nocebo*“ Effekt, bei dem gezeigt werden konnte, dass Patient\*innen, die wissen, dass sie mit einem Statin behandelt werden, häufiger Muskelbeschwerden aufweisen als Patient\*innen, die nicht wissen, mit welchem Medikament sie behandelt werden (232). Dadurch könnte die tatsächliche Anzahl an Patient\*innen mit Statin-assoziierten Muskelschäden überschätzt werden. Auch zum Leberparenchym gibt es widersprüchliche Ergebnisse, einerseits konnten förderliche antioxidative Effekte der Statine bei NASH und reperfundiertem Lebergewebe festgestellt werden (246, 247), andererseits induzieren sie bei diabetischem Zustandsbild oxidativen Stress und Inflammation im Lebergewebe (244). Leberschädigungen sind zwar insgesamt eine seltene Nebenwirkung von Statinen, können jedoch potenziell fatal enden und sollten deshalb nicht vernachlässigt werden (374). In reperfundiertem Nierenparenchym zeigten Statine ähnlich wie in der Leber positive antioxidative Effekte (251). Statine scheinen allgemein eine lindernde Wirkung auf die Abstoßung von transplantierten Organen zu haben und legen daher eine hohe Relevanz in der Transplantationsmedizin nahe (249, 250, 252). Erwähnenswert sind auch neurologische Aspekte im Zusammenhang mit der ROS-modulierenden Wirkung der Statine, so reduzieren sie oxidativen Stress in Neuronen des Hippocampus (240, 255), zeigen protektive Wirkung auf neuronale Stammzellen (242), normalisieren eine gesteigerte Sympathikusaktivität in der rostralen ventrolateralen Medulla (259) und steigern die antioxidative Aktivität bei Schlaganfallpatient\*innen ohne Läsionen in der *Substantia Alba* (261). Diese Fähigkeiten machen die Statine interessant in der Prävention altersassoziierter neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson.

Die Acetylsalicylsäure weist zwar antioxidative Eigenschaften auf (270, 271), trotzdem existiert bei einem gewissen Anteil der Bevölkerung (24,7% bei Männern mit kardiovaskulären Erkrankungen (274)) eine Resistenz gegen die Wirkung des Medikaments, an welcher Sauerstoffradikale ursächlich beteiligt sind (273, 275, 276, 278). Die Kombination von Acetylsalicylsäure mit Clopidogrel und Weiterentwicklungen des Medikaments, wie ZYZ-803 oder ACS14, verbessern dessen antioxidative Effekte. Clopidogrel und Ticagrelor als Monotherapie zeigen ebenfalls verbesserte antioxidative Eigenschaften gegenüber der Acetylsalicylsäure (280, 281, 283, 287, 288, 290, 291). Die Weiterentwicklung eines sehr gut erforschten und häufig verwendeten Medikaments wie der Acetylsalicylsäure durch das Hinzufügen von neuen Eigenschaften und gleichzeitigem Reduzieren seiner Nebenwirkungen erscheint vielversprechend in der Behandlung und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen, welche einen Hauptrisikofaktor für Multimorbidität im Alter darstellen.

Neben den direkten Wirkungen von Metformin auf altersassoziierte Prozesse zeigt Metformin teilweise unabhängig von seiner glukosesenkenden Wirkung vorteilhafte Effekte auf altersassoziierte degenerative Erkrankungen in kardiovaskulärem und neuronalem Gewebe (301-305, 313, 316, 317, 325, 328). Die Schlüsselmechanismen dahinter sind abhängig vom jeweiligen Zelltyp. In Makrophagen scheint Metformin über die Inhibierung der ROS Produktion des Komplex 1 der Atmungskette eine Vorstufe von IL-1 $\beta$  zu hemmen und IL-10 zu fördern. Dies geschieht wahrscheinlich nicht über einen direkt antioxidativen Effekt auf die ROS durch Metformin, sondern durch die Blockade des reversen Elektronentransport von Komplex II zu Komplex I (318). In Endothelzellen hingegen reduziert Metformin die ROS Produktion über die Blockade der PKC Aktivität und Membrantranslokation (319). Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass Metformin nur über die AMPK den Komplex I inhibiert, gibt es Hinweise, dass Metformin eher über den NR4A1 in die Atmungskette eingreift und so vor Hyperglykämie-induzierten Endothelschäden schützt (313, 314).

Es sei noch erwähnt, dass es außerhalb von medikamentösen Wirkstoffen Supplemente gibt, die Einfluss auf die ROS-Modulation nehmen können. Dazu zählen Vitamin A (335, 337-339, 343-345, 375), C (334, 353-355, 359, 361, 363) und E (334, 364), Selen (376-379), Zink (380-382) und Lithium (383-385). Ebenso scheint körperliche Aktivität Einfluss auf endogene Abwehrmechanismen gegen ROS nehmen zu können (386).

Die Suche nach lebensverlängernden Mechanismen spielen in der modernen Medizin seit jeher eine wichtige Rolle. Eine reine Verlängerung der Lebenszeit macht das Leben allerdings nicht unbedingt lebenswert. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, den Fokus zu erweitern und Effekte, die ein gesundes Altern und die Verbesserung der Lebensqualität fördern, zu erforschen. In dieser Arbeit wurde versucht, in bereits zugelassenen, sehr sicheren Wirkstoffen, potenzielle Kandidaten dafür zu identifizieren. Eine klinische Evidenz, die Medikamente für eine Primärprävention einzusetzen, konnte aufgrund eines Mangels an klinischen Studien nicht gefunden werden. Trotzdem bergen vorklinische Studienergebnisse und das Verständnis für die genauen molekularen Mechanismen der ROS Regulation das Potential, zukünftig besser Einfluss auf pathophysiologische Prozesse nehmen zu können und diese sogar zu verhindern.

## Literaturverzeichnis

1. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol*. 2012;22(17):R741-52.
2. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-30.
3. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab*. 2005;1(6):401-8.
4. Akhigbe R, Ajayi A. The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids Health Dis*. 2021;20(1):23.
5. Harman D. Free radical theory of aging. *Triangle*. 1973;12(4):153-8.
6. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med*. 2013;60:1-4.
7. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan*. 2014;3:6.
8. Sun T, Wu H, Cong M, Zhan J, Li F. Meta-analytic evidence for the anti-aging effect of hormesis on *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(3):2723-46.
9. Nazarewicz RR, Ziolkowski W, Vaccaro PS, Ghafourifar P. Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. *Rejuvenation research*. 2007;10(4):435-40.
10. Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol*. 2010;20(23):2131-6.
11. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15):5785-90.
12. Calabrese EJ, Baldwin LA, Holland CD. Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Anal*. 1999;19(2):261-81.
13. Calabrese EJ. Hormesis: Path and Progression to Significance. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
14. Cypser JR, Tedesco P, Johnson TE. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*. 2006;41(10):935-9.
15. Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*. 2005;120(4):449-60.
16. Lithgow GJ, Walker GA. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(7):765-71.
17. Lithgow GJ, White TM, Melov S, Johnson TE. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7540-4.
18. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(2):327-36.
19. Tapia PC. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Med Hypotheses*. 2006;66(4):832-43.
20. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*. 2014;12(2):288-341.
21. Pallauf K, Bendall JK, Scheiermann C, Watschinger K, Hoffmann J, Roeder T, et al. Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food Chem Toxicol*. 2013;58:255-63.
22. Lin J, Cook NR, Albert C, Zaharris E, Gaziano JM, Van Denburgh M, et al. Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(1):14-23.
23. Katsiki N, Manes C. Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr*. 2009;28(1):3-9.
24. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-62.

25. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(5):H2023-31.
26. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010;45(7-8):466-72.
27. Pizzinat N, Copin N, Vindis C, Parini A, Cambon C. Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;359(5):428-31.
28. Madreiter-Sokolowski CT, Thomas C, Ristow M. Interrelation between ROS and Ca(2+) in aging and age-related diseases. *Redox Biol.* 2020;36:101678.
29. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(47):49064-73.
30. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2016;100:14-31.
31. Laurindo FR, Araujo TL, Abrahao TB. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(17):2755-75.
32. Parascandolo A, Laukkanen MO. Carcinogenesis and Reactive Oxygen Species Signaling: Interaction of the NADPH Oxidase NOX1-5 and Superoxide Dismutase 1-3 Signal Transduction Pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(3):443-86.
33. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012;110(10):1364-90.
34. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981-90.
35. Labunskyy VM, Gladyshev VN. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(12):1362-72.
36. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes 1. *The FASEB Journal.* 1992;6(9):2675-83.
37. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 2009;77(8):1303-15.
38. Wang Y, Branicky R, Noe A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-28.
39. Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(8):435-45.
40. Gencer S, Evans BR, van der Vorst EPC, Doring Y, Weber C. Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis. *Cells.* 2021;10(2).
41. Suarez-Rivero JM, Pastor-Maldonado CJ, Povea-Cabello S, Alvarez-Cordoba M, Villalon-Garcia I, Talaveron-Rey M, et al. From Mitochondria to Atherosclerosis: The Inflammation Path. *Biomedicines.* 2021;9(3).
42. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018;62(3):341-60.
43. Salnikova D, Orekhova V, Grechko A, Starodubova A, Bezsonov E, Popkova T, et al. Mitochondrial Dysfunction in Vascular Wall Cells and Its Role in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16).
44. Yamashita SI, Kanki T. How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation coupled with mitochondrial fragmentation. *Autophagy.* 2017;13(5):980-1.
45. Mishra SR, Mahapatra KK, Behera BP, Patra S, Bhol CS, Panigrahi DP, et al. Mitochondrial dysfunction as a driver of NLRP3 inflammasome activation and its modulation through mitophagy for potential therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021;136:106013.
46. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011;12(3):222-30.
47. Stefanatos R, Sanz A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett.* 2018;592(5):743-58.

48. Sanda GM, Stancu CS, Deleanu M, Toma L, Niculescu LS, Sima AV. Aggregated LDL turn human macrophages into foam cells and induce mitochondrial dysfunction without triggering oxidative or endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*. 2021;16(1):e0245797.
49. Panov AV, Dikalov SI. Cardioplin, Perhydroxyl Radicals, and Lipid Peroxidation in Mitochondrial Dysfunctions and Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1323028.
50. Rottenberg H, Hoek JB. The Mitochondrial Permeability Transition: Nexus of Aging, Disease and Longevity. *Cells*. 2021;10(1).
51. Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med*. 2008;263(2):167-78.
52. Desdín-Micó G, Soto-Herederó G, Aranda JF, Oller J, Carrasco E, Gabandé-Rodríguez E, et al. T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. *Science*. 2020;368(6497):1371-6.
53. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):813-24.
54. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*. 2015;163(3):560-9.
55. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.
56. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749-62.
57. Lim CB, Prele CM, Baltic S, Arthur PG, Creaney J, Watkins DN, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species drive GANT61-induced mesothelioma cell apoptosis. *Oncotarget*. 2015;6(3):1519-30.
58. Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414(1):5-8.
59. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(1):30-8.
60. Li L, Chen Y, Gibson SB. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal*. 2013;25(1):50-65.
61. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*. 2015;24(10):1150-63.
62. Win S, Than TA, Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death. *Cell Death Dis*. 2014;5:e989.
63. Orr AL, Vargas L, Turk CN, Baaten JE, Matzen JT, Dardov VJ, et al. Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III. *Nat Chem Biol*. 2015;11(11):834-6.
64. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(9):505-13.
65. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):660-6.
66. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. 2011;472(7344):476-80.
67. Kim S, Kim MJ, Park DY, Chung HJ, Kim CH, Yoon JH, et al. Mitochondrial reactive oxygen species modulate innate immune response to influenza A virus in human nasal epithelium. *Antiviral Res*. 2015;119:78-83.
68. Russell EG, Cotter TG. New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;319:221-54.
69. Ostman A, Frijhoff J, Sandin A, Bohmer FD. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J Biochem*. 2011;150(4):345-56.
70. Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*. 2005;121(5):667-70.

71. Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, et al. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 2011;14(4):537-44.
72. Schaar CE, Dues DJ, Spielbauer KK, Machiela E, Cooper JF, Senchuk M, et al. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet.* 2015;11(2):e1004972.
73. Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 2017;22(1):11-9.
74. Freed JK, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species and vascular function: less is more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(4):673-5.
75. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(5):R1014-30.
76. Kim YW, West XZ, Byzova TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(3):323-8.
77. Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* 2014;123(5):625-31.
78. Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JY. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci.* 2013;20:69.
79. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011;194(1):7-15.
80. Ahmad KA, Yuan Yuan D, Nawaz W, Ze H, Zhuo CX, Talal B, et al. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. *Free Radic Res.* 2017;51(4):428-38.
81. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003;91(3A):7A-11A.
82. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
83. Sorriento D, De Luca N, Trimarco B, Iaccarino G. The Antioxidant Therapy: New Insights in the Treatment of Hypertension. *Front Physiol.* 2018;9:258.
84. Gomez-Alamillo C, Juncos LA, Cases A, Haas JA, Romero JC. Interactions between vasoconstrictors and vasodilators in regulating hemodynamics of distinct vascular beds. *Hypertension.* 2003;42(4):831-6.
85. Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(3):1058-64.
86. Balakumar P, Jagadeesh G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared? *Pharmacol Res.* 2010;62(5):365-83.
87. Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, Feng N, Lai EW, Bedja D, et al. Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. *Circ Res.* 2010;106(1):193-202.
88. Saitoh S, Zhang C, Tune JD, Potter B, Kiyooka T, Rogers PA, et al. Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(12):2614-21.
89. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(3):909-13.
90. Chidgey J, Fraser PA, Aaronson PI. Reactive oxygen species facilitate the EDH response in arterioles by potentiating intracellular endothelial Ca(2+) release. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:274-84.
91. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1521-30.

92. Ikumi Y, Shiroto T, Godo S, Saito H, Tanaka S, Ito A, et al. Important Roles of Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Coronary Microcirculation and Cardiac Diastolic Function in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020;75(1):31-40.
93. Munoz M, Lopez-Oliva ME, Pinilla E, Martinez MP, Sanchez A, Rodriguez C, et al. CYP epoxygenase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries. *Free Radic Biol Med.* 2017;106:168-83.
94. Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res.* 2003;93(6):573-80.
95. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation research.* 2003;92(2):e31-e40.
96. Zhao Q, Zhao Z, Leung-Pineda V, Wiley CL, Nelson PJ, Grenache DG, et al. Predicting respiratory distress syndrome using gestational age and lamellar body count. *Clin Biochem.* 2013;46(13-14):1228-32.
97. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol.* 2021;11(1):200358.
98. Johnson J, Mercado-Ayon E, Mercado-Ayon Y, Dong YN, Halawani S, Ngaba L, et al. Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys.* 2021;702:108698.
99. Jia C, Chen H, Zhang J, Zhou K, Zhuge Y, Niu C, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases. *Int Immunopharmacol.* 2019;67:311-8.
100. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy.* 2005;4(2):147-71.
101. Lee WJ, Ou HC, Wu CM, Lee IT, Lin SY, Lin LY, et al. Sesamin mitigates inflammation and oxidative stress in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem.* 2009;57(23):11406-17.
102. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000;90(1-3):19-25.
103. Okon IS, Zou MH. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol Res.* 2015;100:170-4.
104. Gao L, Loveless J, Shay C, Teng Y. Targeting ROS-Mediated Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1260:1-12.
105. Burtenshaw D, Kitching M, Redmond EM, Megson IL, Cahill PA. Reactive Oxygen Species (ROS), Intimal Thickening, and Subclinical Atherosclerotic Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:89.
106. Ketelhuth DF, Hansson GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost.* 2011;106(5):779-86.
107. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(11):42.
108. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao Q. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2019;112:54-71.
109. Kita T. [Hyperlipidemia and atherosclerosis]. *Nihon Rinsho.* 2002;60(5):851-9.
110. Inoue T, Node K. Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. *J Hypertens.* 2006;24(11):2121-30.
111. Najafi M, Roustazadeh A, Alipoor B. Ox-LDL Particles: Modified Components, Cellular Uptake, Biological Roles and Clinical Assessments. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2011;11(2):119-28.
112. Khosravi M, Poursaleh A, Ghasempour G, Farhad S, Najafi M. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biol Chem.* 2019;400(6):711-32.
113. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-35.
114. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):274-8.

115. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol.* 2008;23(3):381-90.
116. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(6):338-49.
117. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909-50.
118. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol.* 2009;50(5):402-9.
119. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8563845.
120. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
121. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):29-38.
122. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280(4):C719-41.
123. Zhao J, Chen H, Liu N, Chen J, Gu Y, Chen J, et al. Role of Hyperhomocysteinemia and Hyperuricemia in Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26(12):2695-9.
124. Badran A, Nasser SA, Mesmar J, El-Yazbi AF, Bitto A, Fardoun MM, et al. Reactive Oxygen Species: Modulators of Phenotypic Switch of Vascular Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22).
125. Sun HJ, Zhao MX, Ren XS, Liu TY, Chen Q, Li YH, et al. Salusin-beta Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Intimal Hyperplasia After Vascular Injury via ROS/NFkappaB/MMP-9 Pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(18):1045-57.
126. Wang Y, Ji L, Jiang R, Zheng L, Liu D. Oxidized high-density lipoprotein induces the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by promoting the production of ROS. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(3):204-16.
127. Rodriguez AI, Csanyi G, Ranayhossaini DJ, Feck DM, Blose KJ, Assatourian L, et al. MEF2B-Nox1 signaling is critical for stretch-induced phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):430-8.
128. Lu QB, Wan MY, Wang PY, Zhang CX, Xu DY, Liao X, et al. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFkappaB/mTOR/P70S6K signaling cascade. *Redox Biol.* 2018;14:656-68.
129. Cho JR, Lee CY, Lee J, Seo HH, Choi E, Chung N, et al. MicroRNA-761 inhibits Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting mammalian target of rapamycin. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015;63(1):45-56.
130. Pan S, Lin H, Luo H, Gao F, Meng L, Zhou C, et al. Folic acid inhibits dedifferentiation of PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cells by suppressing mTOR/P70S6K signaling. *Am J Transl Res.* 2017;9(3):1307-16.
131. Chia CW, Egan JM, Ferrucci L. Age-Related Changes in Glucose Metabolism, Hyperglycemia, and Cardiovascular Risk. *Circ Res.* 2018;123(7):886-904.
132. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest.* 2003;112(7):1049-57.
133. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.
134. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1071-80.
135. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A

- potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1395-403.
136. Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4).
  137. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019;24(8).
  138. Simpson DSA, Oliver PL. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(8).
  139. Europe A. Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of dementia in Europe. *Alzheimer Europe*. 2019:108.
  140. Patterson C. World alzheimer report 2018. 2018.
  141. Jack Jr CR, Holtzman DM, Sperling R. Dementia is not synonymous with Alzheimer's disease. *American Association for the Advancement of Science*; 2019. p. eaav0511.
  142. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*. 2018;14:450-64.
  143. Kozłowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coordination Chemistry Reviews*. 2012;256(19-20):2129-41.
  144. Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Hayashi Y, et al. Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry*. 2007;46(44):12737-43.
  145. Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(2):45-53.
  146. Ward NC, Wu JH, Clarke MW, Puddey IB, Burke V, Croft KD, et al. The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Hypertension*. 2007;25(1):227-34.
  147. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2007;297(8):842-57.
  148. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *Jama*. 2005;293(11):1338-47.
  149. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*. 2003;361(9374):2017-23.
  150. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England journal of medicine*. 1996;334(18):1150-5.
  151. Barardo D, Thornton D, Thoppil H, Walsh M, Sharifi S, Ferreira S, et al. The DrugAge database of aging-related drugs. *Aging Cell*. 2017;16(3):594-7.
  152. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab*. 2012;15(5):713-24.
  153. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-5.
  154. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):721-6.
  155. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 2013;493(7432):338-45.
  156. Lamming DW, Ye L, Sabatini DM, Baur JA. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *J Clin Invest*. 2013;123(3):980-9.

157. Soefje SA, Karnad A, Brenner AJ. Common toxicities of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Target Oncol.* 2011;6(2):125-9.
158. Moskalev A, Chernyagina E, Tsvetkov V, Fedintsev A, Shaposhnikov M, Krut'ko V, et al. Developing criteria for evaluation of geroprotectors as a key stage toward translation to the clinic. *Aging Cell.* 2016;15(3):407-15.
159. Xiong LG, Chen YJ, Tong JW, Gong YS, Huang JA, Liu ZH. Epigallocatechin-3-gallate promotes healthy lifespan through mitohormesis during early-to-mid adulthood in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol.* 2018;14:305-15.
160. do Vale GT, Ceron CS, Gonzaga NA, Simplicio JA, Padovan JC. Three Generations of  $\beta$ -blockers: History, Class Differences and Clinical Applicability. *Curr Hypertens Rev.* 2019;15(1):22-31.
161. Gorre F, Vandekerckhove H. Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta Cardiol.* 2010;65(5):565-70.
162. Costa VM, Silva R, Tavares LC, Vitorino R, Amado F, Carvalho F, et al. Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology.* 2009;260(1-3):84-96.
163. Loperena R, Van Beusecum JP, Itani HA, Engel N, Laroumanie F, Xiao L, et al. Hypertension and increased endothelial mechanical stretch promote monocyte differentiation and activation: roles of STAT3, interleukin 6 and hydrogen peroxide. *Cardiovascular Research.* 2018;114(11):1547-63.
164. Nakamura K, Murakami M, Miura D, Yunoki K, Enko K, Tanaka M, et al. Beta-Blockers and Oxidative Stress in Patients with Heart Failure. *Pharmaceuticals (Basel).* 2011;4(8):1088-100.
165. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(7):165768.
166. Oliveira PJ, Esteves T, Rolo AP, Palmeira CM, Moreno AJ. Carvedilol inhibits the mitochondrial permeability transition by an antioxidant mechanism. *Cardiovasc Toxicol.* 2004;4(1):11-20.
167. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
168. Kametani R, Miura T, Harada N, Shibuya M, Wang R, Tan H, et al. Carvedilol inhibits mitochondrial oxygen consumption and superoxide production during calcium overload in isolated heart mitochondria. *Circ J.* 2006;70(3):321-6.
169. Liu J, Wang M. Carvedilol protection against endogenous Abeta-induced neurotoxicity in N2a cells. *Cell Stress Chaperones.* 2018;23(4):695-702.
170. Wu T, Li H, Lan Q, Zhao ZA, Cao Y, Zhou P, et al. Protective effects of S-carvedilol on doxorubicin-induced damages to human umbilical vein endothelial cells and rats. *J Appl Toxicol.* 2019;39(8):1233-44.
171. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-12.
172. Zhang QL, Yang JJ, Zhang HS. Carvedilol (CAR) combined with carnosic acid (CAA) attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing excessive oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:71-83.
173. Chen M, Chen S, Lin D. Carvedilol protects bone marrow stem cells against hydrogen peroxide-induced cell death via PI3K-AKT pathway. *Biomed Pharmacother.* 2016;78:257-63.
174. Magadmi RM, Alsulaimani MA, Al-Rafiah AR, Esmat A. The Neuroprotective Effect of Carvedilol on Diabetic Neuropathy: An In Vitro Study. *J Diabetes Res.* 2021;2021:6927025.
175. Sgobbo P, Pacelli C, Grattagliano I, Villani G, Cocco T. Carvedilol inhibits mitochondrial complex I and induces resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -mediated oxidative insult in H9C2 myocardial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1767(3):222-32.
176. Mochizuki M, Yano M, Oda T, Tateishi H, Kobayashi S, Yamamoto T, et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca<sup>2+</sup> leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(16):1722-32.

177. Asdaq SMB, Alamri AS, Alsanie WF, Alhomrani M. Cardioprotective Potential of Garlic Oil and Its Active Constituent, Diallyl Disulphide, in Presence of Carvedilol during Chronic Isoprenaline Injection-Mediated Myocardial Necrosis in Rats. *Molecules*. 2021;26(17).
178. Asdaq SMB, Challa O, Alamri AS, Alsanie WF, Alhomrani M, Almutiri AH, et al. Cytoprotective Potential of Aged Garlic Extract (AGE) and Its Active Constituent, S-allyl-l-cysteine, in Presence of Carvedilol during Isoproterenol-Induced Myocardial Disturbance and Metabolic Derangements in Rats. *Molecules*. 2021;26(11).
179. Alanazi A, Fadda L, Alhusaini A, Ahmad R. Antioxidant, antiapoptotic, and antifibrotic effects of the combination of liposomal resveratrol and carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(7):e22492.
180. Huang H, Shan J, Pan XH, Wang HP, Qian LB. Carvedilol protected diabetic rat hearts via reducing oxidative stress. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(9):725-31.
181. Zhuang XF, Yin CQ, Wang HY, Sun NL. Distinctive effects of carvedilol in the non-infarct zone: remodelling of the ligated rat heart linked to oxidative stress. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1354-64.
182. Huang H, Shan J, Pan XH, Wang HP, Qian LB, Xia Q. Carvedilol improved diabetic rat cardiac function depending on antioxidant ability. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;75(1):7-13.
183. Refaie MMM, El-Hussieny M, Bayoumi AMA, Shehata S. Mechanisms mediating the cardioprotective effect of carvedilol in cadmium induced cardiotoxicity. Role of eNOS and HO1/Nrf2 pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2019;70:103198.
184. Shahbaz AU, Zhao T, Zhao W, Johnson PL, Ahokas RA, Bhattacharya SK, et al. Calcium and zinc dyshomeostasis during isoproterenol-induced acute stressor state. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(2):H636-44.
185. Wu TC, Chen YH, Leu HB, Chen YL, Lin FY, Lin SJ, et al. Carvedilol, a pharmacological antioxidant, inhibits neointimal matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(11):1508-22.
186. Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Danieli Betto D, Germinario E, Angelini A, et al. Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective effect of Carvedilol. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(5):803-7.
187. Toyoda S, Haruyama A, Inami S, Arikawa T, Saito F, Watanabe R, et al. Effects of carvedilol vs bisoprolol on inflammation and oxidative stress in patients with chronic heart failure. *J Cardiol*. 2020;75(2):140-7.
188. Zepeda RJ, Castillo R, Rodrigo R, Prieto JC, Aramburu I, Brugere S, et al. Effect of carvedilol and nebivolol on oxidative stress-related parameters and endothelial function in patients with essential hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;111(5):309-16.
189. Karabacak M, Dogan A, Tayyar S, Bas HA. The effects of carvedilol and nebivolol on oxidative stress status in patients with non-ischaeic heart failure. *Kardiol Pol*. 2015;73(3):201-6.
190. Kowalski J, Banach M, Barylski M, Irzmanski R, Pawlicki L. Carvedilol modifies antioxidant status of patients with stable angina. *Cell Mol Biol Lett*. 2008;13(2):230-9.
191. Lee J, Lee M, Kim JU, Song KI, Choi YS, Cheong SS. Carvedilol reduces plasma 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in mild to moderate hypertension: a pilot study. *Hypertension*. 2005;45(5):986-90.
192. Baraka SA, Tolba MF, Elsherbini DA, El-Naga RN, Awad AS, El-Demerdash E. Rosuvastatin and low-dose carvedilol combination protects against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats: Role of PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021;48(10):1358-70.
193. Zaatari G, Fintel DJ, Subacius H, Germano JJ, Shani J, Goldberger JJ. Comparison of Metoprolol Versus Carvedilol After Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2021;147:1-7.
194. Jonsson G, Abdelnoor M, Seljeflot I, Arnesen H, Hostmark AT, Kjeldsen SE, et al. The antioxidative effects of long-term treatment are more pronounced for carvedilol than for atenolol in post-myocardial infarction patients. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49(1):27-32.

195. Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Watanabe T, Yoshikawa J, Asada A. Effects of carvedilol on oxidative stress in polymorphonuclear and mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Am J Med.* 2004;116(7):460-5.
196. Kowalski J, Błaszczuk J, Kowalski M, Cegliński T, Wróbel W, Irzmański R, et al. [Effect of carvedilol on lipid peroxidation in patients with stable angina]. *Pol Merkur Lekarski.* 2005;18(104):156-9.
197. Budni P, Pedrosa RC, Garlet TR, Dalmarco EM, Dalmarco JB, Lino MR, et al. Carvedilol attenuates oxidative stress in chronic chagasic cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98(3):218-24.
198. Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation.* 2001;103(6):904-12.
199. Bicket DP. Using ACE inhibitors appropriately. *Am Fam Physician.* 2002;66(3):461-8.
200. Carey RM. AT2 Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *Am J Hypertens.* 2017;30(4):339-47.
201. Carey RM. Update on angiotensin AT2 receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2017;26(2):91-6.
202. Neves MF, Cunha AR, Cunha MR, Gismondi RA, Oigman W. The Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Its New Components in Arterial Stiffness and Vascular Aging. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2018;25(2):137-45.
203. Chen R, Suchard MA, Krumholz HM, Schuemie MJ, Shea S, Duke J, et al. Comparative First-Line Effectiveness and Safety of ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers: A Multinational Cohort Study. *Hypertension.* 2021;78(3):591-603.
204. Jiang L, Zhou X, Yang H, Guan R, Xin Y, Wang J, et al. Upregulation of AT(1) Receptor Mediates a Pressor Effect Through ROS-SAPK/JNK Signaling in Glutamatergic Neurons of Rostral Ventrolateral Medulla in Rats With Stress-Induced Hypertension. *Front Physiol.* 2018;9:1860.
205. Yu Y, Jiang H, Niu Y, Zhang X, Zhang Y, Liu XI, et al. Candesartan inhibits inflammation through an angiotensin II type 1 receptor independent way in human embryonic kidney epithelial cells. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(2):e20180699.
206. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens.* 2008;21(1):72-7.
207. Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood.* 2004;104(12):3591-7.
208. Kim KJ, Filosa JA. Advanced in vitro approach to study neurovascular coupling mechanisms in the brain microcirculation. *J Physiol.* 2012;590(7):1757-70.
209. Zinkevich NS, Fancher IS, Gutterman DD, Phillips SA. Roles of NADPH oxidase and mitochondria in flow-induced vasodilation of human adipose arterioles: ROS-induced ROS release in coronary artery disease. *Microcirculation.* 2017;24(6).
210. Jukic I, Mihaljevic Z, Matic A, Mihalj M, Kozina N, Selthofer-Relatic K, et al. Angiotensin II type 1 receptor is involved in flow-induced vasomotor responses of isolated middle cerebral arteries: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(4):H1609-h24.
211. Wolin MS, Gupte SA, Neo BH, Gao Q, Ahmad M. Oxidant-redox regulation of pulmonary vascular responses to hypoxia and nitric oxide-cGMP signaling. *Cardiol Rev.* 2010;18(2):89-93.
212. Ateyya H, Nader MA, El-Sherbeeney NA. Beneficial effects of rosiglitazone and losartan combination in diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(3):215-20.
213. Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, et al. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci.* 2006;79(2):121-9.
214. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;105(14):1656-62.

215. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(6):F1144-52.
216. Satoh M, Fujimoto S, Arakawa S, Yada T, Namikoshi T, Haruna Y, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates uncoupled endothelial nitric oxide synthase in rats with experimental diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(12):3806-13.
217. Oak J-H, Cai H. Attenuation of Angiotensin II Signaling Recouples eNOS and Inhibits Nonendothelial NOX Activity in Diabetic Mice. *Diabetes.* 2007;56(1):118-26.
218. Kumar S, Dietrich N, Kornfeld K. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span. *PLoS Genet.* 2016;12(2):e1005866.
219. de Cavanagh EM, Piotrkowski B, Basso N, Stella I, Inserra F, Ferder L, et al. Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats. *Faseb j.* 2003;17(9):1096-8.
220. Connat JL, Busseuil D, Gambert S, Ody M, Tébalchini M, Gamboni S, et al. Modification of the rat aortic wall during ageing; possible relation with decrease of peptidergic innervation. *Anat Embryol (Berl).* 2001;204(6):455-68.
221. Basso N, Cini R, Pietrelli A, Ferder L, Terragno NA, Inserra F. Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(3):H1351-8.
222. Takaya T, Kawashima S, Shinohara M, Yamashita T, Toh R, Sasaki N, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2006;186(2):402-10.
223. Knorr M, Hausding M, Kröller-Schuhmacher S, Steven S, Oelze M, Heeren T, et al. Nitroglycerin-induced endothelial dysfunction and tolerance involve adverse phosphorylation and S-Glutathionylation of endothelial nitric oxide synthase: beneficial effects of therapy with the AT1 receptor blocker telmisartan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(10):2223-31.
224. Ashcheulova T, Gerasimchuk N, Kovalyova O, Honchar O. Beneficial effects of combined therapy with lacidipine and candesartan in obese hypertensive patients. *Rom J Intern Med.* 2018;56(4):257-64.
225. Buda V, Andor M, Cristescu C, Voicu M, Cochera F, Tuduce P, et al. The effect of candesartan on pentraxin-3 plasma levels as marker of endothelial dysfunction in patients with essential arterial hypertension. *Ir J Med Sci.* 2017;186(3):621-9.
226. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* 2014;88:3-11.
227. Harrington RA. Statins—Almost 30 Years of Use in the United States and Still Not Quite There. *JAMA Cardiology.* 2017;2(1):66-.
228. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2017;120(1):229-43.
229. Mollazadeh H, Tavana E, Fanni G, Bo S, Banach M, Pirro M, et al. Effects of statins on mitochondrial pathways. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12(2):237-51.
230. Bouitbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J.* 2012;33(11):1397-407.
231. Bouitbir J, Daussin F, Charles AL, Rasseneur L, Dufour S, Richard R, et al. Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins. *Muscle Nerve.* 2012;46(3):367-73.
232. Gupta A, Thompson D, Whitehouse A, Collier T, Dahlof B, Poulter N, et al. Adverse events associated with unblinded, but not with blinded, statin therapy in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid-Lowering Arm (ASCOT-LLA): a randomised double-blind placebo-controlled trial and its non-randomised non-blind extension phase. *Lancet.* 2017;389(10088):2473-81.
233. Barrientos G, Sánchez-Aguilera P, Jaimovich E, Hidalgo C, Llanos P. Membrane Cholesterol in Skeletal Muscle: A Novel Player in Excitation-Contraction Coupling and Insulin Resistance. *J Diabetes Res.* 2017;2017:3941898.

234. Sakamoto K, Kimura J. Mechanism of statin-induced rhabdomyolysis. *Journal of pharmacological sciences*. 2013;123(4):289-94.
235. Deichmann R, Lavie C, Andrews S. Coenzyme q10 and statin-induced mitochondrial dysfunction. *Ochsner J*. 2010;10(1):16-21.
236. Schirris TJ, Renkema GH, Ritschel T, Voermans NC, Bilos A, van Engelen BG, et al. Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. *Cell Metab*. 2015;22(3):399-407.
237. Ahmadi Y, Ghorbanihaghjo A, Naghi-Zadeh M, Yagin NL. Oxidative stress as a possible mechanism of statin-induced myopathy. *Inflammopharmacology*. 2018;26(3):667-74.
238. Bouitbir J, Singh F, Charles AL, Schlagowski AI, Bonifacio A, Echaniz-Laguna A, et al. Statins Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in Glycolytic Skeletal Muscle. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(2):84-98.
239. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. *European cardiovascular disease statistics 2017*. 2017.
240. Yadollah-Damavandi S, Sharifi ZN, Arani HZ, Jangholi E, Karimi A, Parsa Y, et al. Atorvastatin Prevents the Neuron Loss in the Hippocampal Dentate Gyrus Region through its Anti-Oxidant and Anti-Apoptotic Activities. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2021;20(1):76-86.
241. Saeedi Saravi SS, Saeedi Saravi SS, Arefidoust A, Dehpour AR. The beneficial effects of HMG-CoA reductase inhibitors in the processes of neurodegeneration. *Metab Brain Dis*. 2017;32(4):949-65.
242. Varmazyar R, Noori-Zadeh A, Abbaszadeh HA, Hamidabadi HG, Rajaei F, Darabi S, et al. Neural stem cells neuroprotection by simvastatin via autophagy induction and apoptosis inhibition. *Bratisl Lek Listy*. 2019;120(10):744-51.
243. Pengrattanachot N, Cherngwell R, Jaikumkao K, Pongchaidecha A, Thongnak L, Swe MT, et al. Atorvastatin attenuates obese-induced kidney injury and impaired renal organic anion transporter 3 function through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(6):165741.
244. Zeng H, Liu Z. Atorvastatin Induces Hepatotoxicity in Diabetic Rats via Oxidative Stress, Inflammation, and Anti-Apoptotic Pathway. *Med Sci Monit*. 2019;25:6165-73.
245. Björnsson ES. Hepatotoxicity of statins and other lipid-lowering agents. *Liver Int*. 2017;37(2):173-8.
246. Alexandropoulos D, Bazigos GV, Doulamis IP, Tzani A, Konstantopoulos P, Tragotsalou N, et al. Protective effects of N-acetylcystein and atorvastatin against renal and hepatic injury in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:673-80.
247. Rodrigues G, Moreira AJ, Bona S, Schemitt E, Marroni CA, Di Naso FC, et al. Simvastatin Reduces Hepatic Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Nonalcoholic Steatohepatitis Experimental Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3201873.
248. Sharma RS, Harrison DJ, Kisielewski D, Cassidy DM, McNeilly AD, Gallagher JR, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;5(3):367-98.
249. Rostami Z, Moteshaker Arani M, Salesi M, Safiabadi M, Einollahi B. Effect of Statins on Patients and Graft Survival in Kidney Transplant Recipients: a Survival Meta-analysis. *Iran J Kidney Dis*. 2017;11(5):329-38.
250. Patel SS, Rodriguez VA, Siddiqui MB, Faridnia M, Lin FP, Chandrakumaran A, et al. The Impact of Coronary Artery Disease and Statins on Survival After Liver Transplantation. *Liver Transpl*. 2019;25(10):1514-23.
251. Cusumano G, Romagnoli J, Liuzzo G, Ciavarella LP, Severino A, Copponi G, et al. N-Acetylcysteine and High-Dose Atorvastatin Reduce Oxidative Stress in an Ischemia-Reperfusion Model in the Rat Kidney. *Transplant Proc*. 2015;47(9):2757-62.
252. Vallakati A, Reddy S, Dunlap ME, Taylor DO. Impact of Statin Use After Heart Transplantation: A Meta-Analysis. *Circ Heart Fail*. 2016;9(10).

253. Sozer V. Ameliorative effect of statin therapy on oxidative damage in heart tissue of hypercholesterolemic rabbits. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(6):558-66.
254. Wang Y, Bai L, Lin Y, Chen Y, Guan H, Zhu N, et al. Combined use of probucol and cilostazol with atorvastatin attenuates atherosclerosis in moderately hypercholesterolemic rabbits. *Lipids Health Dis*. 2015;14:82.
255. Zhang G, Li M, Xu Y, Peng L, Yang C, Zhou Y, et al. Antioxidation Effect of Simvastatin in Aorta and Hippocampus: A Rabbit Model Fed High-Cholesterol Diet. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6929306.
256. Naresh S, Bitla AR, Rao P, Sachan A, Amancharla YL. Efficacy of oral rosuvastatin intervention on HDL and its associated proteins in men with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2021;71(1):76-86.
257. Deo SH, Fisher JP, Vianna LC, Kim A, Chockalingam A, Zimmerman MC, et al. Statin therapy lowers muscle sympathetic nerve activity and oxidative stress in patients with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(3):H377-85.
258. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, et al. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res*. 2004;95(9):937-44.
259. Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, et al. Simvastatin therapy normalizes sympathetic neural control in experimental heart failure: roles of angiotensin II type 1 receptors and NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2005;112(12):1763-70.
260. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1581-90.
261. Kang HG, Cheong JS, Lim IH, Yun KH, Park HY. Antioxidative activity of statins and HDL-PON1 association in lacunar ischemic stroke with and without white matter hyperintensity. *Signa Vitae*. 2021;17(2):104-10.
262. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*. 2012;129(3):220-4.
263. Thachil J. Antiplatelet therapy - a summary for the general physicians. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(2):152-60.
264. Iqbal AM, Lopez RA, Hai O. *Antiplatelet Medications*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

265. Vara D, Cifuentes-Pagano E, Pagano PJ, Pula G. A novel combinatorial technique for simultaneous quantification of oxygen radicals and aggregation reveals unexpected redox patterns in the activation of platelets by different physiopathological stimuli. *Haematologica*. 2019;104(9):1879-91.
266. Fuentes E, Moore-Carrasco R, de Andrade Paes AM, Trostchansky A. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2019;24(6):509-20.
267. Fuentes E, Gibbins JM, Holbrook LM, Palomo I. NADPH oxidase 2 (NOX2): A key target of oxidative stress-mediated platelet activation and thrombosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2018;28(7):429-34.
268. Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17(2):48-54.
269. Pastori D, Pignatelli P, Carnevale R, Violi F. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;120:50-5.
270. Chen B, Zhao J, Zhang S, Wu W, Qi R. Aspirin inhibits the production of reactive oxygen species by downregulating Nox4 and inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59(5):405-12.
271. Jorda A, Aldasoro M, Aldasoro C, Guerra-Ojeda S, Iradi A, Vila JM, et al. Action of low doses of Aspirin in Inflammation and Oxidative Stress induced by  $\alpha\beta(1-42)$  on Astrocytes in primary culture. *Int J Med Sci*. 2020;17(6):834-43.

272. Kumar A, Kao J. Platelet resistance to antiplatelet drugs. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2009;4(2):98-108.
273. Kranzhofer R, Ruef J. Aspirin resistance in coronary artery disease is correlated to elevated markers for oxidative stress but not to the expression of cyclooxygenase (COX) 1/2, a novel COX-1 polymorphism or the P1A(1/2) polymorphism. *Platelets.* 2006;17(3):163-9.
274. Ebrahimi P, Farhadi Z, Behzadifar M, Shabaninejad H, Abolghasem Gorji H, Taheri Mirghaed M, et al. Prevalence rate of laboratory defined aspirin resistance in cardiovascular disease patients: A systematic review and meta-analysis. *Caspian J Intern Med.* 2020;11(2):124-34.
275. Russo I, Viretto M, Barale C, Mattiello L, Doronzo G, Pagliarino A, et al. High glucose inhibits the aspirin-induced activation of the nitric oxide/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway and does not affect the aspirin-induced inhibition of thromboxane synthesis in human platelets. *Diabetes.* 2012;61(11):2913-21.
276. Bala M, Chin CN, Logan AT, Amin T, Marnett LJ, Boutaud O, et al. Acetylation of prostaglandin H2 synthases by aspirin is inhibited by redox cycling of the peroxidase. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(7):1472-81.
277. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15069-74.
278. Santilli F, Lapenna D, La Barba S, Davi G. Oxidative stress-related mechanisms affecting response to aspirin in diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* 2015;80:101-10.
279. Kodela R, Chattopadhyay M, Kashfi K. NOSH-Aspirin: A Novel Nitric Oxide-Hydrogen Sulfide-Releasing Hybrid: A New Class of Anti-inflammatory Pharmaceuticals. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(3):257-62.
280. Wu D, Hu Q, Xiong Y, Zhu D, Mao Y, Zhu YZ. Novel H(2)S-NO hybrid molecule (ZYZ-803) promoted synergistic effects against heart failure. *Redox Biol.* 2018;15:243-52.
281. Huang Q, Sparatore A, Del Soldato P, Wu L, Desai K. Hydrogen sulfide releasing aspirin, ACS14, attenuates high glucose-induced increased methylglyoxal and oxidative stress in cultured vascular smooth muscle cells. *PLoS One.* 2014;9(6):e97315.
282. Blandizzi C, Tuccori M, Colucci R, Fornai M, Antonioli L, Ghisu N, et al. Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. *Pharmacol Res.* 2009;59(2):90-100.
283. Liu L, Cui J, Song CJ, Bian JS, Sparatore A, Soldato PD, et al. H(2)S-releasing aspirin protects against aspirin-induced gastric injury via reducing oxidative stress. *PLoS One.* 2012;7(9):e46301.
284. Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine.* 2010;48(4):493-8.
285. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357(24):2482-94.
286. Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, et al. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002;100(3):917-24.
287. Hadi NR, Mohammad BI, Ajeena IM, Sahib HH. Antiatherosclerotic potential of clopidogrel: antioxidant and anti-inflammatory approaches. *Biomed Res Int.* 2013;2013:790263.
288. Heitzer T, Rudolph V, Schwedhelm E, Karstens M, Sydow K, Ortak M, et al. Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1648-52.
289. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1045-57.

290. Nanhwan MK, Ling S, Kodakandla M, Nylander S, Ye Y, Birnbaum Y. Chronic treatment with ticagrelor limits myocardial infarct size: an adenosine and cyclooxygenase-2-dependent effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(9):2078-85.
291. Ye Y, Birnbaum GD, Perez-Polo JR, Nanhwan MK, Nylander S, Birnbaum Y. Ticagrelor protects the heart against reperfusion injury and improves remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(8):1805-14.
292. Narayan P, Mentzer RM, Jr., Lasley RD. Adenosine A1 receptor activation reduces reactive oxygen species and attenuates stunning in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(1):121-9.
293. Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J. Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280(1):301-9.
294. Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International.* 2004;21(3):115-7.
295. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia.* 2017;60(9):1566-76.
296. Flory J, Lipska K. Metformin in 2019. *Jama.* 2019;321(19):1926-7.
297. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017;60(9):1577-85.
298. Kulkarni AS, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. *Cell Metab.* 2020;32(1):15-30.
299. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev.* 2012;11(2):230-41.
300. Johnson SC. Nutrient Sensing, Signaling and Ageing: The Role of IGF-1 and mTOR in Ageing and Age-Related Disease. *Subcell Biochem.* 2018;90:49-97.
301. De Haes W, Froominckx L, Van Assche R, Smolders A, Depuydt G, Billen J, et al. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(24):E2501-9.
302. Admasu TD, Chaithanya Batchu K, Barardo D, Ng LF, Lam VYM, Xiao L, et al. Drug Synergy Slows Aging and Improves Healthspan through IGF and SREBP Lipid Signaling. *Dev Cell.* 2018;47(1):67-79.e5.
303. Smith DL, Jr., Elam CF, Jr., Mattison JA, Lane MA, Roth GS, Ingram DK, et al. Metformin supplementation and life span in Fischer-344 rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010;65(5):468-74.
304. Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One.* 2010;5(1):e8758.
305. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2192.
306. Slack C, Foley A, Partridge L. Activation of AMPK by the putative dietary restriction mimetic metformin is insufficient to extend lifespan in *Drosophila*. *PLoS One.* 2012;7(10):e47699.
307. Alfaras I, Mitchell SJ, Mora H, Lugo DR, Warren A, Navas-Enamorado I, et al. Health benefits of late-onset metformin treatment every other week in mice. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017;3:16.
308. Anisimov VN, Berstein LM, Popovich IG, Zabezhinski MA, Egormin PA, Piskunova TS, et al. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany NY).* 2011;3(2):148-57.
309. Widmer RJ, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014;2014(3):291-308.
310. Nafisa A, Gray SG, Cao Y, Wang T, Xu S, Wattoo FH, et al. Endothelial function and dysfunction: Impact of metformin. *Pharmacol Ther.* 2018;192:150-62.
311. Mather KJ, Verma S, Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(5):1344-50.

312. de Jager J, Kooy A, Schalkwijk C, van der Kolk J, Lehert P, Bets D, et al. Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Intern Med.* 2014;275(1):59-70.
313. Pulakazhi Venu VK, Saifeddine M, Mihara K, Faiza M, Gorobets E, Flewelling AJ, et al. **Metformin prevents hyperglycaemia-associated, oxidative stress-induced vascular endothelial dysfunction: essential role for the orphan nuclear receptor, Nr4a1 (Nur77).** *Molecular Pharmacology.* 2021:MOLPHARM-AR-2020-000148.
314. Venu VKP, Saifeddine M, Mihara K, Faiza M, Gorobets E, Flewelling AJ, et al. Metformin Prevents Hyperglycemia-Associated, Oxidative Stress-Induced Vascular Endothelial Dysfunction: Essential Role for the Orphan Nuclear Receptor Human Nuclear Receptor 4A1 (Nur77). *Mol Pharmacol.* 2021;100(5):428-55.
315. Shah MS, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res.* 2016;118(11):1808-29.
316. Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, et al. Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission. *Diabetes.* 2017;66(1):193-205.
317. Li A, Zhang S, Li J, Liu K, Huang F, Liu B. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;434:36-47.
318. Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, O'Neill LA. Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages. *J Biol Chem.* 2015;290(33):20348-59.
319. Mahrouf M, Ouslimani N, Peynet J, Djelidi R, Couturier M, Therond P, et al. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(2):176-83.
320. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* 2005;54(6):829-34.
321. Kitada M, Koya D, Sugimoto T, Isono M, Araki S, Kashiwagi A, et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2003;52(10):2603-14.
322. Gallo A, Ceolotto G, Pinton P, Iori E, Murphy E, Rutter GA, et al. Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism. *Diabetes.* 2005;54(4):1123-31.
323. Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(5):421-40.
324. Shang F, Zhang J, Li Z, Zhang J, Yin Y, Wang Y, et al. Cardiovascular Protective Effect of Metformin and Telmisartan: Reduction of PARP1 Activity via the AMPK-PARP1 Cascade. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151845.
325. Oliveira PWC, de Sousa GJ, Birocale AM, Gouvêa SA, de Figueiredo SG, de Abreu GR, et al. Chronic metformin reduces systemic and local inflammatory proteins and improves hypertension-related cardiac autonomic dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2020;30(2):274-81.
326. Barton M. Obesity and aging: determinants of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 2010;460(5):825-37.
327. Bettio LEB, Rajendran L, Gil-Mohapel J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;79:66-86.
328. Gorgich EAC, Parsaie H, Yarmand S, Baharvand F, Sarbishegi M. Long-term administration of metformin ameliorates age-dependent oxidative stress and cognitive function in rats. *Behav Brain Res.* 2021;410:113343.
329. Said HM. Water-soluble vitamins. *World Rev Nutr Diet.* 2015;111:30-7.
330. Reddy P, Jialal I. Biochemistry, Fat Soluble Vitamins. *StatPearls. Treasure Island (FL)2022.*

331. Palawaththa S, Islam RM, Illic D, Rabel K, Lee M, Romero L, et al. Effect of maternal dietary niacin intake on congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*. 2021.
332. Yakoob MY, Lo CW. Nutrition (Micronutrients) in Child Growth and Development: A Systematic Review on Current Evidence, Recommendations and Opportunities for Further Research. *J Dev Behav Pediatr*. 2017;38(8):665-79.
333. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*. 2019;71(4):430-41.
334. Higgins MR, Izadi A, Kaviani M. Antioxidants and Exercise Performance: With a Focus on Vitamin E and C Supplementation. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(22).
335. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. 2017;174(11):1290-324.
336. Johnson JD. Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(3):321-3.
337. Truscott TG. Beta-carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *J Photochem Photobiol B*. 1996;35(3):233-5.
338. Ribeiro D, Freitas M, Silva AMS, Carvalho F, Fernandes E. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food Chem Toxicol*. 2018;120:681-99.
339. Kaźmierczak-Barańska J, Boguszewska K, Adamus-Grabicka A, Karwowski BT. Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*. 2020;12(5).
340. Gilbert C. What is vitamin A and why do we need it? *Community Eye Health*. 2013;26(84):65.
341. Saini RK, Nile SH, Park SW. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Res Int*. 2015;76(Pt 3):735-50.
342. Gammone MA, Riccioni G, D'Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr Res*. 2015;59:26762.
343. Saini RK, Rengasamy KRR, Mahomoodally FM, Keum YS. Protective effects of lycopene in cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases: An update on epidemiological and mechanistic perspectives. *Pharmacol Res*. 2020;155:104730.
344. Zeng J, Zhao J, Dong B, Cai X, Jiang J, Xue R, et al. Lycopene protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating oxidative stress. *J Nutr Biochem*. 2019;66:70-8.
345. Xu J, Hu H, Chen B, Yue R, Zhou Z, Liu Y, et al. Lycopene Protects against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Alleviating ER Stress Induced Apoptosis in Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136443.
346. Gajendragadkar PR, Hubsch A, Mäki-Petäjä KM, Serg M, Wilkinson IB, Cheriyan J. Effects of oral lycopene supplementation on vascular function in patients with cardiovascular disease and healthy volunteers: a randomised controlled trial. *PLoS One*. 2014;9(6):e99070.
347. Palozza P, Parrone N, Simone RE, Catalano A. Lycopene in atherosclerosis prevention: an integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. *Arch Biochem Biophys*. 2010;504(1):26-33.
348. Thies F, Mills LM, Moir S, Masson LF. Cardiovascular benefits of lycopene: fantasy or reality? *Proc Nutr Soc*. 2017;76(2):122-9.
349. Al-Delaimy WK, van Kappel AL, Ferrari P, Slimani N, Steghens JP, Bingham S, et al. Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr*. 2004;7(6):713-22.
350. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996;334(18):1150-5.

351. The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance. The ATBC Cancer Prevention Study Group. *Ann Epidemiol.* 1994;4(1):1-10.
352. Myllylä R, Majamaa K, Günzler V, Hanauske-Abel HM, Kivirikko KI. Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase. *J Biol Chem.* 1984;259(9):5403-5.
353. Njus D, Kelley PM, Tu YJ, Schlegel HB. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2020;159:37-43.
354. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AM, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Crit Care.* 2014;18(4):460.
355. Timoshnikov VA, Kobzeva TV, Polyakov NE, Kontoghiorghes GJ. Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).
356. Amrein K, Oudemans-van Straaten HM, Berger MM. Vitamin therapy in critically ill patients: focus on thiamine, vitamin C, and vitamin D. *Intensive Care Med.* 2018;44(11):1940-4.
357. Carr AC, Rosengrave PC, Bayer S, Chambers S, Mehrtens J, Shaw GM. Hypovitaminosis C and vitamin C deficiency in critically ill patients despite recommended enteral and parenteral intakes. *Crit Care.* 2017;21(1):300.
358. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury.* 2007;38(12):1336-45.
359. Spoelstra-de Man AME, Elbers PWG, Oudemans-Van Straaten HM. Vitamin C: should we supplement? *Curr Opin Crit Care.* 2018;24(4):248-55.
360. Tsai MS, Huang CH, Tsai CY, Chen HW, Cheng HJ, Hsu CY, et al. Combination of intravenous ascorbic acid administration and hypothermia after resuscitation improves myocardial function and survival in a ventricular fibrillation cardiac arrest model in the rat. *Academic Emergency Medicine.* 2014;21(3):257-65.
361. Rössig L, Hoffmann J, Hugel B, Mallat Z, Haase A, Freyssinet JM, et al. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation.* 2001;104(18):2182-7.
362. Desjardins D, Cacho-Valadez B, Liu JL, Wang Y, Yee C, Bernard K, et al. Antioxidants reveal an inverted U-shaped dose-response relationship between reactive oxygen species levels and the rate of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 2017;16(1):104-12.
363. Lebel M, Massip L, Garand C, Thorin E. Ascorbate improves metabolic abnormalities in *Wrn* mutant mice but not the free radical scavenger catechin. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1197:40-4.
364. Niki E, Traber MG. A history of vitamin E. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(3):207-12.
365. Zaaboul F, Liu Y. Vitamin E in foodstuff: Nutritional, analytical, and food technology aspects. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2022.
366. Aune D, Keum N, Giovannucci E, Fadnes LT, Boffetta P, Greenwood DC, et al. Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(5):1069-91.
367. Pahrudin Arrozi A, Shukri SNS, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA, Ahmad Damanhuri MH, Jaafar F, et al. Comparative Effects of Alpha- and Gamma-Tocopherol on Mitochondrial Functions in Alzheimer's Disease In Vitro Model. *Scientific Reports.* 2020;10(1):8962.
368. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS, Aggarwal NT, et al. Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *The American journal of clinical nutrition.* 2005;81(2):508-14.
369. Grodstein F, Chen J, Willett WC. High-dose antioxidant supplements and cognitive function in community-dwelling elderly women. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2003;77(4):975-84.

370. Power R, Nolan JM, Prado-Cabrero A, Roche W, Coen R, Power T, et al. Omega-3 fatty acid, carotenoid and vitamin E supplementation improves working memory in older adults: A randomised clinical trial. *Clin Nutr*. 2022;41(2):405-14.
371. Kryscio RJ, Abner EL, Caban-Holt A, Lovell M, Goodman P, Darke AK, et al. Association of Antioxidant Supplement Use and Dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA Neurol*. 2017;74(5):567-73.
372. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama*. 2009;301(1):39-51.
373. Panov AV, Dikalov SI. Cardiolipin, perhydroxyl radicals, and lipid peroxidation in mitochondrial dysfunctions and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020.
374. Björnsson ES. Hepatotoxicity of statins and other lipid-lowering agents. *Liver International*. 2017;37(2):173-8.
375. Johnson JD. Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? *Free Radic Biol Med*. 2009;47(3):321-3.
376. Zheng Z, Liu L, Zhou K, Ding L, Zeng J, Zhang W. Anti-Oxidant and Anti-Endothelial Dysfunctional Properties of Nano-Selenium in vitro and in vivo of Hyperhomocysteinemic Rats. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:4501-21.
377. Zhang JS, Gao XY, Zhang LD, Bao YP. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*. 2001;15(1):27-38.
378. Musik I, Kocot J, Lewandowska A, Żelazowska R, Kiełczykowska M. The investigation of the possible protective influence of selenium on antioxidant barrier in heart of rats exposed to lithium. *Life Sciences*. 2015;132:1-5.
379. Kim JS, Kim SH, Park SK. Selenocysteine modulates resistance to environmental stress and confers anti-aging effects in *C. elegans*. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017;72(8):491-8.
380. Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Słotwińska M, Kamińska T, Śnieżko R, Paduch R, et al. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*. 2000;145(2):159-71.
381. Kumar J, Barhydt T, Awasthi A, Lithgow GJ, Killilea DW, Kapahi P. Zinc Levels Modulate Lifespan through Multiple Longevity Pathways in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153513.
382. Ho E, Quan N, Tsai YH, Lai W, Bray TM. Dietary zinc supplementation inhibits NFkappaB activation and protects against chemically induced diabetes in CD1 mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(2):103-11.
383. Li H, Huang K, Liu X, Liu J, Lu X, Tao K, et al. Lithium chloride suppresses colorectal cancer cell survival and proliferation through ROS/GSK-3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:241864.
384. Aminzadeh A, Dehpour AR, Safa M, Mirzamohammadi S, Sharifi AM. Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway. *Cell Mol Neurobiol*. 2014;34(8):1143-50.
385. Khairova R, Pawar R, Salvatore G, Juruena MF, de Sousa RT, Soeiro-de-Souza MG, et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol Med Rep*. 2012;5(3):680-2.
386. Bouviere J, Fortunato RS, Dupuy C, Werneck-de-Castro JP, Carvalho DP, Louzada RA. Exercise-Stimulated ROS Sensitive Signaling Pathways in Skeletal Muscle. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(4).