

Nikotinamid Mononukleotid: Egy Új Lehetőség a Vaszkuláris Demencia Kezelésére

PhD Tézis Összefoglaló

Dr. Kiss Tamás

**Témavezető:
Dr. Ungvári Zoltán**

University of Oklahoma Health Sciences Center



**Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Általános Orvostudományi Kar
Szegei Tudomány Egyetem**



**Szeged
2020**

Bevezetés

Az elmúlt évek egyik fontos tudományos felismerése, hogy öregedés során az agyi mikrokeringés állapota meghatározó az agy egészének egészsége szempontjából. Az öregedés az agyi mikrokeringés szerkezeti és funkcionális károsodását okozza, mely szignifikánsan hozzájárul az életkorral összefüggő kognitív hanyatlás kialakulásához. Európa népessége gyorsan öregszik így egyre fontosabb lenne hatékony és elérhető módszerek kifejlesztése, amelyek megelőzhetik vagy késleltethetik a kognitív zavarok és a demencia kialakulását.

Az agyi homeosztázis fenntartásához szorosan ellenőrzött oxigén- és tápanyag-ellátásra, valamint a káros bomlástermékek hatékony eltávolítására van szükség. Az agyszövet korlátozott energia és oxigén tartalékkal rendelkezik, így az agyi véráramlás csökkenése vagy szabályozatlansága esetén az idegrendszeri funkciók csak rövid ideig fenntarthatók. Öregedéssel a kapilláris hálózat megritkulása szignifikánsan hozzájárul az agyi véráramlás csökkenéséhez mely veszélyezteti az aktív idegsejtek oxigén- és tápanyagellátását, így iszkémiás gócok kialakulásához, idegsejtek diszfunkciójához és demyelinizációhoz vezet. Az intenzív, térben és időben dinamikus változó neuron aktivitás a regionális oxigén- és glükózzállítás gyors alkalmazkodását igényli. Ezt egy evolúciósan konzervált élettani mechanizmus, a neurovaszkuláris csatolás biztosítja. A neurovaszkuláris csatolást az aktivált idegsejtek, asztrociták, endotél sejtek, periciták és simaizomsejtek összehangolt, szorosan ellenőrzött kommunikációja hozza létre. A funkcionális hiperémia elégtelenségét („neurovaszkuláris szétkapcsolás”) az öregedéssel kapcsolatos, a kognitív teljesítmény

romlásával járó betegségek széles spektrumában (magas vérnyomás, az elhízás és az Alzheimer-kór) megfigyelték.

A NAD^+ egy kulcsfontosságú koenzim az állati sejtekben, mivel sebességmeghatározó az elektron átadással járó biokémiai reakciókban. A sejtekben a kor előre haladtával csökken a NAD^+ koncentrációja, mely feltételezhetően az öregedés egyik kulcsfontosságú hajtóereje. Ennek az öregedéssel párhuzamos NAD^+ kimerülésnek fontos szerepe lehet az időskorhoz kapcsolódó krónikus betegségek széles spektrumának kialakulásában. A nikotinamid-mononukleotid (NMN) a NAD^+ szintézis előanyaga. A sejtek a keringésből nagy hatékonysággal veszik fe, viszont ennek a pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert. Az NMN a nikotinamid-mononukleotid-adenil-transzferáz (NMAT) enzim közvetítésével, az úgy nevezett „mentő útvonalon” keresztül NAD^+ -á alakul át és növeli a sejtek NAD^+ koncentrációját. Az NMN terápiás potenciálját nagyban növeli, hogy szájon át adható és farmakokinetikája az emberi szervezetben kiváló.

A mikroRNS-ek (miRNS) rövid, endogén, nem kódoló transzkriptumok, amelyek poszttranszkripciós szinten szabályozzák a génkifejeződést. Az eddigi tanulmányok szering a miRNS-szabályozás hozzájárul az endotél sejtek öregedéssel megjelenő fenotípus változásaihoz. A korábbi ígéretes eredmények ellenére a pontos érrendszeri miRNS interakciókat még nem sikerült tisztázni.

Célkitűzés

Az itt bemutatott tanulmány célja annak a hipotézisnek a tesztelése volt, hogy az agyi kapilláris endotél sejtek NAD⁺ szintjének helyreállítása nikotinamid-mononukleotid kezeléssel javíthatja-e az agyi mikrokeringés egészségét az öregedés során. Hipotézisünket egy átfogó *in vitro* és *in vivo* kísérleteket tartalmazó vizsgálatsorozatban teszteltük.

Céljaink:

1. Megvizsgálni az NMN kezelés hatásait az agyi kapilláris endotél sejtek proliferációs és tubulus formáló képességére.
2. Megvizsgálni, hogyan hat az NMN kezelés az oxidatív szabadgyök termelődésre az agyi kapilláris endotél sejtekben.
3. Megvizsgálni, hogyan hat az NMN kezelés a kísérleti állatok kognitív és motoros funkciójára.
4. Megvizsgálni az NMN kezelés hatását az agyi kapilláris keringés, így a neurovaszkuláris csatolás működésére.
5. A megfigyelt élettani változások háttérében álló molekuláris jelátviteli utak feltérképezése.

Anyagok és Módszerek

In vitro:

Primer agyi kapilláris endotél sejt kultúra: Az *in vitro* méréseinkhez használt agyi kapilláris endotél sejteket Fischer 344 x Brown Norway (F344xBN) hibrid patkányok agyából izoláltunk. Az állatokat a National Institute of Aging kolóniájából szereztünk be. Korábbi tapasztalatok és szakirodalmi adatok alapján ez a típus az öregedés biológiájának tanulmányozására az egyik első körben választandó modell. Az állatokat a University of Oklahoma Health Sciences Center SPF (specific-pathogen-free) állatházában tartottuk. Az állatok tartása és kísérletes felhasználása a National Institute of Health szabályait betartva történt a University of Oklahoma Állatkísérletes Etikai Bizottságának engedélyével és felügyeletével.

Az állatok szabályszerű eutanáziát követően összegyűjtött szövetet mechanikus és enzimikus módszerrel feltártuk és az endotél sejteket két lépcsőben izoláltuk. Első lépésben gradiens centrifugálást, második lépcsőben mágnesezhető mikroyöngykapcsolt antitest jelölést követő frakcionált mágneses elválasztást használtunk.

Proliferációs és kapilláris képző potenciál mérése:

Proliferációs képesség: Az endotél sejtek proliferációs képességét VEGF stimulációt követően áramlási citometria alapú Guava CellGrowth assay segítségével mértük. A sejteket 1 carboxifluorescein-diacetát-succinimidil-észter (CFSE) festékkel inkubáltuk. 24 órás VEGF stimulációt követően a sejteket

összegyűjtöttük, mostuk, az elhalt sejtek kiszűrésére propidium-jodiddal festettük és áramlási citometriával mértük.

Migrációs képesség: Az endotél sejtek migrációját VEGF stimulációt követően a sejtek bazális és apikális oldala közötti elektromos impedancia mérésén alapuló ECIS (Electric cell-substrate impedance sensing) eszköz segítségével mértük. A sejteket speciális ezüst elektródokkal ellátott tenyésztő csészékben inkubáltuk és az impedanciát folyamatosan rögzítettük. Amikor az impedancia elérte platót, a sejteket egy nagy energiájú impulzusnak vetettük alá, mely a sejtek egy részét elpusztította. Az elhalt sejtek leválását az impedancia hirtelen csökkenése jelezte. Ezt követően a sejteket VEGF-fel stimuláltuk. A stimuláció során a migrációs sebességet a stimuláló elektróda mérete és az impedancia görbe változása alapján határoztuk meg.

Tubulus képzés: Az endotél sejteket egy erre a célra fejlesztett Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix médiumban növesztettük. A tenyésztő csészék egy részéhez EX-527-et, a sirtuin 1 szelektív gátlószerét adtuk. A tubulus képzést semiquantitatív módon, NIS-Elements mikroszkóppal mértük és hasonlítottuk össze a csoportok között.

Oxidatív szabadgyök képződésének mérése: Az endotél sejtek oxidatív szabadgyök termelését a CM-H₂DCFDA (5(és6)-klórmethyl-2',7'-diklór-dihidrofluorescein-diacetát-acetil-észtert), a membránon átjutó oxidatív fluoreszcens indikátor festékkel történt jelölést követően áramlási citometriával mértük.

SIRT1 and SIRT2 gének kiütése shRNS segítségével: A sirtuin jelátvitel szerepét az NMN hatásának közvetítésében a SIRT1 és SIRT2 shRNS (short hairpin RNS) segítségével vizsgáltuk. A

sejteket az elektroporáción alapuló Amaxa Nucleofector technológiával transzfektáltuk. A további méréseket a transzfekció utáni második napon hajtottuk végre.

Mitokondriális funkció mérése:

Reaktív oxigén szabadgyökök: Az endotél sejteket mitokondriális oxidatív szabadgyök termelését a superoxid érzékeny MitoSOX Red mitokondrium-specifikus fluoreszcens festékkel történő jelölést követően áramlási citometria segítségével mértük.

Mitokondriális membránpotenciál: Az endotél sejteket mitokondriális membránpotenciálját a JC-1 mitokondrium-specifikus fluoreszcens festékkel történő jelölést követően áramlási citometria segítségével mértük.

A mitokondriumok oxigén felhasználása: Az endotél sejtek oxigén felhasználását Seahorse XF96 készülék segítségével mértük.

NO termelés mérése: Az endotél sejtek NO termelését a DAF-FM fluoreszcens indikátor (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorescein) segítségével áramlási citometria segítségével mértük.

ATP szint mérése: Az endotél sejtek ATP szintjének mérésére az ENLITEN ATP bioluminescent assay-t használtuk. A sejteket homogenizáltuk és luciferáz jelenlétében inkubáltuk. A fluoreszcenciát Tecan Infinite M200 plate reader segítségével mértük.

In vivo:

A kísérleti állatok: Az *in vivo* kísérleteinkhez 3 és 24 hónapos C57BL/6 egereket használtunk. A 24 hónapos állatok egy csoportját 14 napig napi 2 alkalommal (6 és 20 órakor) peritonealisan 500 mg/ttkg NMN-nel injekcióztuk.

Kognitív és motoros tesztek:

Radial arm water maze teszt: A hippocampuszhoz kötött tanulási és memória funkciókat Radial arm water maze teszt segítségével mértük. Az útvesztő nyolc, egymáshoz közepén kapcsolódó karból áll, melyet vízzel töltöttünk fel. A menekülési platform az egyik kar végén a víz alá merült. A teszt során regisztráltuk, hogy az adott állat mennyi idő alatt jut ki az útvesztőből és hogy mennyi hibát vét a kifelé vezető úton.

Elevated plus maze teszt módosított tanulási protokollja: A tanulási és memória funkciókat Elevated plus maze teszt segítségével is vizsgáltuk. A 40 cm-rel a padló felé emelt útvesztőt két nyitott és két zárt karból áll, melyek derékszögben egy központi platformon találkoznak. Az egereket egyesével az egyik nyitott kar végére helyezük és mértük mikor haladnak át a középvonalon és érik el a zárt részt.

Novel object recognition teszt: A tanulási és memória funkciókat Novel object recognition teszt segítségével is vizsgáltuk. A teszt három egymást követő részből, egy habituációs, egy ismerkedési és egy próba szakaszból áll. A habituációs szakasz során az állatok 5 percen keresztül szabadon felfedezték az üres „open-field” arénát. Ezután az egerek mellé két percig két, azonos tárgyat helyeztünk. 4 órával később, az egészet megismételtük a próba fázis során azzal a különbséggel, hogy az állatok két percen keresztül egy ismert

tárgyat és egy új tárgyat vizsgálhattak. Eközben végig regisztráltuk az állatok mozgását az arénában, különös tekintettel, melyik tárgy közelében mennyi időt töltenek.

Rotarod teszt: Az állatok motoros koordinációt és egyensúlyát egy automata négy-sávú rotarod eszköz alkalmazásával vizsgáltuk. Az egereket a forgó kerékre helyeztük és a kerék sebességét egyenletesen növeltük, amíg az állat le nem esett. A keréken töltött időt és a maximális fordulatszámot rögzítettük.

Grip strength teszt: Az állatok maximális izom erejét a mellső végtagban Grip strength készülék segítségével mértük. A mérést egerenként három alkalommal ismételtük.

CatWalk teszt: Az állatok egyensúlyát, járását, illetve a mozgás koordináció térbeli és időbeli aspektusait a CatWalk rendszer segítségével vizsgáltuk. A megvilágított üveglapon futó állat lépéseit alulról egy nagy sebességű, nagy felbontású kamerával rögzítettük és egy speciális, erre a célra írt szoftverrel elemeztük.

Neurovaszkuláris csatolás mérése: Az állatokat izoflurános altatást követően endotracheálisan intubáltuk és mechanikusan lélegeztettük. Az artériás vérnyomást a femorális artériába vezetett kanülön keresztül mértük. Az egereket koponyáját egy sztereotaxiás keretre fogtuk és nyitott koponyaablakkal láttuk el, melyet mesterséges cerebrospinalis folyadékkal töltöttünk fel. A hiperémiát a jobb oldali bajuszpárna elektromos stimulációjával váltottuk ki és a bal oldali szomatoszenzoros kéreg fölött lézeres Doppler-próbával mértük.

Oxidatív stressz mérése az agykéregben: A kéregben kialakuló oxidatív stresszt mérésére a 3-nitrotirozint, a peroxinitrit képződés indirekt markerét használtuk. A szövetmintákat homogenizáltuk és

OxiSelect Protein Nitrotyrosine ELISA Kits alkalmazásával mértük.

Endotél funkció mérése az aortában: Az endotél funkció mérésére frissen izolált 1,5 mm hosszúságú aorta gyűrűket használtunk. Az izometrikus feszültség mérése céljából erre a célra kialakított speciális miográfokat használtunk. A gyűrűket phenylefrin segítségével maximálisan kontraháltuk, majd az endotél-függő vasodilatátor acetilkolin hozzáadásával relaxáltuk.

Az aorta miRNS profilja: Az izolált aorta gyűrűk miRNS kifejeződést RT-qPCR technikával, TaqMan Array Rodent MicroRNA A+B Cards Set v3.0 segítségével mértük. A qPCR adatokat a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel normalizáltuk, és az adatok annotációjára a TargetScan és a Gene Ontology adatbázisokat, illetve az IRIDESCENT (in-Silico Construction of an Entity-based Network from Text) rendszert használtuk.

A neurovaszkuláris egység transzkriptomja: Az állatok szabályszerű eutanáziája után az összegyűjtött agyszövetből mechanikusan és enzimatisz feltárást követően a neurovaszkuláris kapcsolás sejtjeit gradiens centrifugalással majd mágnesezhető mikrogöngy-kapcsolt antitest alapú fracionált mágneses elválasztással gyűjtöttük. Az így nyert sejtekből RNS-t nyertük ki, amit cDNS könyvtárákká írtunk át. A könyvtárak szekvenálása a megfelelő preanalitikai ellenőrzéseket követően Illumina NovaSeq 6000 szekvenátorral végeztük.

A nyert szekvenciák azonosítása és annotálása az egér genom GRCm38 változata alapján a Kallisto v0.43.03 szoftver segítségével végeztük. A kiugró mintákat az adatok főkomponens elemzés

segítségével azonosítottuk. A génkifejeződés változásának szignifikancia szintjét az Empirikus Bayes-módszer segítségével számoltuk. Egy változást szignifikánsnak fogadtunk el, ha a változás abszolút értéke $\geq 1,5$ és a korrigált p-értéke $\leq 0,05$ volt. Az elemzéseket R környezetben végeztük, a Bioconductor projekt szoftveres megadásait, illetve az Ingenuity Pathway Analysis szoftverben implementált algoritmusokat használtuk.

Eredmények

1. A primer agyi kapilláris endotél sejtekkel *in vitro* VEGF stimuláció mellett végzett méréseink megmutatták, hogy az NMN kezelés helyreállította az idős állatokból izolált sejtek öregedéssel elvesztett proliferációs és kapilláris képző potenciálját.
2. Ezekben az idős állatból izolált agyi kapilláris endotél sejtekben az NMN kezelés növelte a mitokondriumok hatékonyságát és csökkentette mitokondriumok szabadgyök termelését, visszaállítva azt a fiatalkori szintre.
3. Az NMN hatásait *in vivo* vizsgálva megmutattuk, hogy a kezelés javította az idős egerek kognitív teljesítményét és motoros funkcióját.
4. Az NMN kezelés sikerrel helyreállította az idős egerek szomatoszenzoros agykérgében a neurovaszkuláris csatolást és javította az izolált aorta gyűrűkben mert az endotél funkciót.
5. Az NMN kezelés az idős állatok aortájában visszafordította a miRNS változásait, melyek öregedés során alakultak ki, illetve a neurovaszkuláris egység sejtjeiben visszafordította az öregedés során lejátszódó mRNS szintű változásokat. A bioinformatikai elemzés megmutatta, hogy a megfigyelt pozitív változások hatását a neurovaszkuláris egység sejtjeire NAD-függő hiszton-deacetiláz Sirt1 szabályozza.

Diszkusszió

Mára általánosan elfogadott, hogy az agyi kapilláris hálózat strukturális és funkcionális károsodása az öregedéssel alapvetően hozzájárul demencia patogeneziséhez. Epidemiológiai jelentősége ellenére jelenleg nincs elérhető gyógyszer ennek a pusztító betegségnek a megelőzésére vagy kezelésére.

A sejtekben a kor előre haladtával csökken a NAD^+ koncentrációja, melyről feltételezhetően az öregedés egyik kulcsfontosságú hajtóereje. Az öregedéssel párhuzamos NAD^+ kimerülésnek fontos szerepe lehet az időskorhoz kapcsolódó krónikus betegségek széles spektrumának kialakulásában. Tanulmányunkban *in vitro* és *in vivo* kísérletek sorozatával mutattunk be és szisztematikusan értékeltük a kis molekulájú NAD^+ előanyag, a nikotinamid mononukleotid (NMN) kezelés hatását az agyi kapilláris endotél sejtekre és a kapilláris keringésre. Továbbá elemeztük az NMN kezelés pozitív hatása mögötti molekuláris változásokat, különös tekintettel a génkifejeződésre. Tudomásunk szerint jelenleg ez a szakirodalomban rendelkezésre álló legátfogóbb tanulmány, amely az NMN hatásait vizsgálja az idős agyi kapilláris hálózatra.

Az idős állatokból izolált primer agyi kapilláris endotél sejtekben csökkent a proliferációs, migrációs és tubulus formáló képesség. Ez a korábban már részletesen vizsgált jelenség a kapilláris hálózat megritkulásához, így az agyi véráramlás csökkenéséhez vezet és veszélyezteti az aktív idegsejtek oxigén- és tápanyagellátását. Méréseink alapján az NMN kezelés szignifikánsan javította az idős állatokból izolált sejtek proliferációs, migrációs és tubulus formáló képességét.

Az öregedés egy másik, ismert, gyakran vizsgált jellemzője a sejtek fokozott oxidatív szabad gyök képződése. Az idős állatokból izolált primer agyi kapilláris endotél sejtekben csökkent mitokondriális membránpotenciált, csökkent oxigénfogyasztást és fokozott szabad gyökök termelését mértünk a fiatal állatoktól izolált sejtekkel összehasonlítva. Az általunk alkalmazott NMN kezelés jelentősen javította a sejtek mitokondriális funkcióját, amelyet a megnövekedett mitokondriális membránpotenciál, a megnövekedett oxigénfogyasztás és a csökkent szabad gyökök termelésének jellemzett. Az *in vitro* végzett méréseket az *in vivo* eredményeink is megerősítették. Az idős egerek NMN kezelése jelentősen csökkentette a nitrogén szabad gyökök mennyiségét a kéregben, amit a 3-nitrotirozin festéssel értékelt módosított fehérjék csökkent szintje jelzett.

Vizsgálatunkban az idős állatokban csökkent tanulási és memóriefunkcióit mértünk, mely egybevágh a szakirodalmi adatokkal és a mi korábbi megfigyeléseinkkel is, ebben az állat modellben. Ezeknél az állatoknál a memória mellett a motoros funkció is romlott. Az alkalmazott NMN kezelést követően az idős egerek szignifikánsan jobban teljesítettek a tanulási és memória tesztsorozatban, mint kezeletlen társaik.

Az öregedéssel járó kognitív károsodás szorosan korrelál a neurovaszkuláris szétkapcsolódással. Ezt a korábban már publikált megfigyelésünket az itt bemutatott adatok is igazolják. Idős állatokban az NMN kezelés helyreállította kontralaterális bajuszpárna ingerlésével kiváltott neurovaszkuláris kapcsolást a szomatoszenzoros kéregben. Megfigyelésünk szoros összefüggésben áll *in vitro* eredményeinkkel, amelyek azt mutatják, hogy az NMN kezelés sikeresen helyreállította a NO felszabadulást a tenyésztett idős agyi kapilláris endotél sejtekben. Egy másik *ex*

vivo kísérletsorozatban az NMN kezelés az idős egerek aortáiban is javította az endoteliális NO-közvetített értágulatokat.

A NMN kezelés élettani hatásainak molekuláris hátterét a génkifejeződés változásainak bioinformatikai elemzésével vizsgáltuk. Az alkalmazott NMN kezelés az idős állatok aorta szövetében megfordította az öregedéssel járó miRNS változásokat. Ez a megfigyelés felveti annak lehetőségét, hogy az NMN kezelés hatásai részben, vagy egészben a gén kifejeződés posztranszkripcióis kontrolljában bekövetkező változások okozzák. Az neurovaszkuláris egységből izolált mRNS szekvenálással nyert adatok funkcionális annotációja azt mutatta, hogy az idős egerekben az NMN kezelés gyulladáscsökkentő, antioxidatív, antiapoptotikus és endotél diszfunkciót gátló transzkripcióis változásokat okoz. Az SIRT1 jelátviteli út kritikus szerepet játszik *upstream* szabályozóként az NMN kezelés jótékony hatásainak kialakulásában. Az *in silico* eredményeinket megerősíti, hogy idős patkányokból származó primer agyi kapilláris endotél sejtekben a SIRT1 shRNS történő leszabályozása megakadályozta az NMN kezelés jótékony hatásait.

Összegzésként elmondható, hogy sikeresen bizonyítottuk, hogy az NMN kezelés széles körű jótékony hatással rendelkezik nemcsak az idős agyi kapilláris endotél sejtekre, hanem az idős egerek magas szintű agyműködésére is. Vizsgálatunk szilárd bizonyítékot szolgáltat arra vonatkozóan, hogy az agyi kapilláris endotél sejtek NAD⁺ szintjének helyreállítása a kis molekulásúlyú NMN segítségével régóta várt, hatékony és biztonságos módszer lehet az időskorral járó vaszkuláris demencia megelőzésére és/vagy kezelésére időseknél.

Köszönetnyilvánítás

Különös köszönettel tartozom mentoraimnak, *Dr. Ungvári Zoltánnak* és *Dr. Csiszár Annának* a szakmai és személyes támogatásért.

Ezen túl köszönöm minden kollégámnak a támogatást és a segítséget. Nélkülük az itt bemutatott munka nem jöhetett volna létre!

A labor jelenlegi és múltbeli tagjai:

Dr. Stefano Tarantini, Dr. Nyúl-Tóth Ádám, Dr. Priya Balasubramanian, Dr. Andriy Yabluchanskiy, Dr. Marta Noa Valcarcel-Ares, Dr. Tóth Péter, Dr. Csípő Tamás, Dr. Lipécz Ágnes, Tripti Gautam, Dr. Tucsek Zsuzsanna.

Külső kollaborátorok:

Dr. Cory B Giles, Dr. Jonathan D Wren, Dr. Lori Garman, Dr. Farkas Eszter, Dr. Süle Zoltán, Dr. David A. Sinclair, Dr. Michael Kinter, Dr. Praveen Ballabh, Dr. Joseph A. Baur, Dr. Csaba Szabo, Dr. Dora Reglodi, Dr. Xin A Zhang, Dr. Bari Ferenc

Végül szeretném megköszönni az anyagi támogatásokat:

- American Heart Association,
- Oklahoma Center for the Advancement of Science and Technology,
- National Institute on Aging,
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke,
- National Institute of General Medical Sciences Oklahoma Shared Clinical and Translational Resources, Molecular Mechanisms and Genetics of Autoimmunity COBRE,
- Presbyterian Health Foundation,
- NIA-supported Geroscience Training Program in Oklahoma,
- Oklahoma Nathan Shock Center,
- Cellular and Molecular GeroScience COBRE.

Tézist Megalapozó Közlemények

I. Nicotinamide Mononucleotide (NMN) Treatment Attenuates Oxidative Stress and Rescues Angiogenic Capacity in Aged Cerebromicrovascular Endothelial Cells: A Potential Mechanism for the Prevention of Vascular Cognitive Impairment; Tamas Kiss, Priya Balasubramanian, Marta Noa Valcarcel-Ares, Stefano Tarantini, Andriy Yabluchanskiy, Tamas Csipo, Agnes Lipecz, Dora Reglodi, Xin A Zhang, Ferenc Bari, Eszter Farkas, Anna Csiszar, Zoltan Ungvari; *Geroscience*, 41 (5): 619-630, Oct 2019 (26 citáció, Q1, IF: 6.44)

II. Nicotinamide Mononucleotide (NMN) Supplementation Rescues Cerebromicrovascular Endothelial Function and Neurovascular Coupling Responses and Improves Cognitive Function in Aged Mice; Stefano Tarantini, Marta Noa Valcarcel-Ares, Peter Toth, Andriy Yabluchanskiy, Zsuzsanna Tucek, Tamas Kiss, Peter Hertelendy, Michael Kinter, Praveen Ballabh, Zoltán Süle, Eszter Farkas, Joseph A Baur, David A Sinclair, Anna Csiszar, Zoltan Ungvari; *Redox Biology*, 24: 101192, Jun 2019 (42 citáció, Q1, IF: 9.986)

III. Nicotinamide Mononucleotide (NMN) Supplementation Promotes Anti-Aging miRNA Expression Profile in the Aorta of Aged Mice, Predicting Epigenetic Rejuvenation and Anti-Atherogenic Effects; Tamas Kiss, Cory B Giles, Stefano Tarantini, Andriy Yabluchanskiy, Priya Balasubramanian, Tripti Gautam, Tamas Csipo, Ádám Nyúl-Tóth, Agnes Lipecz, Csaba Szabo, Eszter Farkas, Jonathan D Wren, Anna Csiszar, Zoltan Ungvari; *Geroscience*, 41 (4): 419-439, Aug 2019 (10 citáció, Q1, IF: 6.44)

IV. Nicotinamide Mononucleotide (NMN) Supplementation Promotes Neurovascular Rejuvenation in Aged Mice: Transcriptional Footprint of SIRT1 Activation, Mitochondrial Protection, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Effects; Tamas Kiss, Ádám Nyúl-Tóth, Priya Balasubramanian, Stefano Tarantini, Chetan Ahire, Andriy Yabluchanskiy, Tamas Csipo, Eszter Farkas, Jonathan D. Wren, Lori Garman, Anna Csiszar, Zoltan Ungvari; *Geroscience*, 42 (2): 527-546, Feb 2020 (6 citáció, Q1, IF: 6.44)