

Hyperglycemia által indukált mitokondriális endothel sérülés kísérletes terápiás gátlása

Doktori tézisek

Dr. Gerő Domokos

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok
Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Mózes Miklós, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Nacs, János, Ph.D., kutatási és fejlesztési igazgató
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

A Komplex Vizsga bizottság elnöke:
Dr. Somogyi Anikó, D.Sc., egyetemi tanár

A Komplex Vizsga bizottság tagjai:
Dr. Jermendy György, D.Sc., c. egyetemi tanár
Dr. Nádasy György, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szőke Éva, D.Sc., ny. egyetemi tanár

Budapest
2018

1. Bevezetés

A diabetes prevalenciája világszerte emelkedik, míg gyakorisága 1980-ban 4,7% volt a 18 év feletti populációban, 2014-re 8,5%-ra emelkedett a prevalencia a felnőttek között. A cukorbetegséggel kapcsolatos kiadások jelenleg a teljes egészségügyi költségvetésnek a 10%-át teszik ki, de a következő 25 évben 70%-os emelkedésre lehet számítani, ami jelentős társadalmi és gazdasági terhet jelent majd. A költségekért elsősorban a cukorbetegség szövődményei tehetők felelőssé. Diabetesben a keringési betegségek kialakulásában a hyperglycemia által indukált endothelsejt károsodás játszik meghatározó szerepet, és az endothel sérülésért legfőképp a glükóz hatására létrejövő oxidatív stressz tehető felelőssé.

2. Célkitűzés

A glükóz által indukált oxidatív stressz játszik szerepet az endothel sejtek károsodásában, melynek elindító folyamata — ha egy egységes mechanizmust („unifying mechanism”) feltételezünk — a mitokondriális szabadgyök termelés. A mitokondriumban maga a légzési lánc termel szabadgyököket, azáltal hogy az elektronokat közvetlenül az oxigénre továbbítja (elsősorban a I. és III. komplexnél), felesleges protont hagyva hátra az intermembrán térben.

Hogy olyan szereket találjunk, melyek gátolják a hyperglycemiában kialakuló endothel károsodást, a következőket tűztük ki célul:

1. A hyperglycemia által indukált endothel károsodás sejtes modelljének létrehozása, melyet a mitokondriális szabadgyökök túltermelése jellemez, és alkalmas közepes áteresztőképességű molekula-szűrésre.
2. A jelenleg elérhető klinikai gyógyszerek és gyógyszerjelölt molekulák, valamint ezekhez hasonló szerek szűrővizsgálatának elvégzése, hogy a glükóz által indukált mitokondriális szabadgyök termelés gátlószereit azonosítsuk.
3. Kiválasztott „hit” molekulák hatásmechanizmusának meghatározása a hyperglycemiás mitokondriális szabadgyök termeléssel szemben.

3. Módszerek

Fenotipikus szűrést végeztünk b.End3 endothel sejteken, hogy azonosítsuk azokat a szereket, melyek gátolják a magas cukorszint hatására kialakuló fokozott mitokondriális szabadgyök termelést. Ehhez 6.766 molekulát tartalmazó, klinikai gyógyszerekből, biológiailag aktív szerekből, illetve természetes anyagokból álló könyvtárat vizsgáltunk meg.

A sejtés és mitokondriális szabadgyök termelést kinetikus mérésekkel vizsgáltuk mitokondriális szuperoxid, illetve hidrogén peroxid érzékeny festékek (MitoSOX Red és 5-(6)-klorometil-2',7'-diklorodihidro-fluoreszcein diacetát, acetil észter (CM-H₂DCFDA)) segítségével.

A mitokondriális oxidáns termelést fluoreszcens mikroszkópiával *in situ* is vizsgáltuk, MitoSOX Red és mitoTracker kettős festést alkalmazva, melyet Hoechst 33342 sejtmagfestéssel egészítettünk ki. A mitokondriális membránpotenciált JC-1 festést követően mértük. Az oxidatív károsodást DNS, RNS és fehérje szinten értékeltük Comet assay, 8-hidroxiguanozin immunfluoreszcens festés, valamint Oxyblot módszer alkalmazásával.

A viabilitás mérésére Hoechst 33342 festést, a metabolizmusára tiazolil kék (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolium bromid, MTT) és laktát dehidrogenáz assay-t használtunk. A sejtek oxigén felhasználását és savtermelését az extracelluláris fluxus (Seahorse, Billerica, MA) mérésével analizáltuk.

Génexpresszió változásokat RNS szinten real-time PCR alapú makro-array vizsgálattal, fehérje szinten Western blottal detektáltunk. A UCP2 expresszió szupprimálására siRNS alapú géncsendesítést alkalmaztunk.

A H₂S pozitív hatását frissen izolált mitokondriumokon, illetve légzési komplex aktivitás mérésével is kimutattuk.

A vascularis védőhatás funkcionális vizsgálatára myographiás vizsgálatot alkalmaztunk diabeteses mintákon, illetve *ex vivo* hyperglycemiának kitett ereken.

4. Eredmények

4.1. Szabadgyök termelést és oxidatív stresszt indukál a hyperglycemia microvascularis endothel sejtekben

A hosszantartó hyperglycemia progresszív emelkedést okozott a microvascularis endothel sejtek mitokondriális szabadgyök termelésében. A glükóz hatására létrejött szabadgyök termelés metabolikus változásokkal járt együtt a sejtekben, ugyanakkor nem volt változás az ATP termeléshez köthető gének expressziójában. Hyperglycemia hatására a sejtekben progresszív emelkedés volt megfigyelhető a mitokondriális MTT redukcióban, ami az aerob metabolizmus és az oxidatív foszforiláció fokozódását mutatja, viszont nem volt változás az anaerob metabolizmusban, ahogy azt a változatlan LDH aktivitás jelezte.

A mitokondriális metabolizmusban megfigyelhető változásokhoz hasonlóan, progresszív emelkedés volt mérhető a mitokondriális membránpotenciálban, ami fokozott szabadgyök termeléssel járt együtt, valamint fokozódott a citoplazmatikus szabadgyök képzés is a sejtekben.

A sejtek energiaszintje változatlan maradt a hyperglycemia első 7 napjában, de ezt követően ATP szintjük csökkenni kezdett. Az emelkedett membránpotenciál ellenére sem tudtak a mitokondriumok elegendő ATP-t termelni, hogy a sejtek alap energiaszükségletét kielégítsék. Mivel nem csökkent a felépített légzési komplexek szintje, a metabolikus deficit feltehetően funkcionális zavart jelent a mitokondriális elektron transzferben (vagy a kemiozmotikus kapcsolatban).

Összefoglalva, a magasabb glükóz kínálat mitokondriális hiperpolarizációt okozott a microvascularis endothel sejtekben, mely felelős lehet a szabadgyökök fokozott termelésének elősegítéséért, így ez a sejttes modell sok tekintetben közös vonásokat mutat a diabetesben látható elváltozásokhoz.

4.2. Sejtes szűrővizsgálat a hyperglycemia által indukált mitokondriális szabadgyök termelés gátlószereinek azonosítására

A fenti sejtes assay-ben vizsgáltuk a biológiai aktivitást mutató szerek hatását mitokondriális szabadgyök termelésre vonatkozóan. A szabadgyök termelés eredmények, valamint a viabilitás értékek normál eloszlást mutattak; a szerek nagy része nem okozott változást sem a mitokondriális szabadgyök termelésben, sem a viabilitásban a primer szűrővizsgálat során. “Hit”-eknek választottuk azokat a nem toxikus szereket, melyek 3 μ M koncentrációban a hyperglycemia hatására létrejött szabadgyök termelést több mint 25%-kal csökkentették. Ezeket a szereket ismételt teszteltük, hogy antioxidáns hatásukat megerősítsük. A hit megerősítésen átment szerek között szteroidok, antioxidáns molekulák, mitokondriális szétkapcsoló szerek és antimetabolitok szerepeltek.

A szűrővizsgálat során azonosított, farmakológiailag aktív szerek különböző csoportjaiból a következő szereket választottuk ki további vizsgálatok céljából: a paroxetint (klinikai használatban levő antidepresszáns szer), a glükokortikoid szteroidokat és két új, mitokondriális hidrogén szulfid donor molekulát, az AP39-et és az AP123-at. Ezek feltételezett hatásmechanizmusát az **Ábra** foglalja össze.

4.3. A “hit” molekulák hatásmechanizmusának karakterizálása

4.3.1. A paroxetin mitokondriális szabadgyök-fogóként hat hyperglycemiás endothel sejtekben

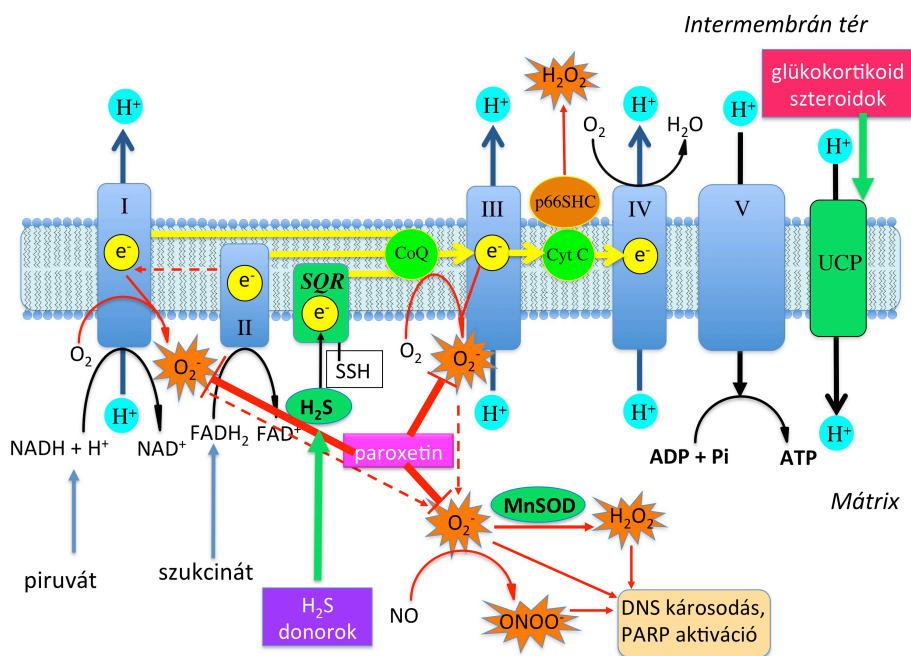
A paroxetin preferenciálisan gátolja a mitokondriális szabadgyök termelést, mely tulajdonság kizárólag rá volt igaz a szelektív szerotonin reuptake gátló szerek közül. A szer antioxidáns hatására azonnali hatáskezdet jellemző, és hatékonysága humán endothel sejtekben is megmutatkozott a mitokondriális szabadgyök termeléssel szemben.

A paroxetin nem befolyásolja a sejtek, illetve izolált mitokondriumok oxigénfogyasztását, és nem volt hatással a sejtek ATP tartalmára sem.

Ugyanakkor sejtmentes körülmények között is hatásosnak mutatkozott a xantin-oxidáz által termelt szuperoxiddal szemben, ami közvetlen gyökfogó hatást jelez.

A paroxetin szuperoxid neutralizáló hatása jól mérhető előnyökkel járt az oxidatív károsodással szemben. Így csökkentette a DNS törést, a 8-hidroziguanozin képződést (mely az RNS oxidatív károsodásának jele) és a mitokondriális fehérje oxidációt is.

A paroxetin védőhatását hyperglycemia által indukált, illetve diabetes hatására kialakuló vascularis dysfuncióban is vizsgáltuk. A szer hyperglycemiában is fenntartotta az erek normális, endothel-függő relaxációját, és hasonlóan gátolta diabetesben is az endothel dysfuncio kialakulását, fenntartva az endothel-függő relaxációt.



Ábra. A hit molekulák lehetséges célpontjai hyperglycemia által indukált szabadgyök termeléssel szemben. A paroxetin közvetlen gyökfogóként, a glükokortikoidok a UCP2 termelés stimulálójaként, a H₂S donorok pedig elektron donorként működnek.

4.3.2. A glükokortikoidok a UCP2 expresszió indukálásával csökkentik a szabadgyök termelést a microvascularis endothel sejtek mitokondriumában

A glükokortikoid szteroidok gátolták a glükóz által indukált mitokondriális szabadgyök termelést, és sok szerepelt közülük “hit-ként” a szűrővizsgálatban. Meglepő módon a glükokortikoid antagonistá mifepriszton (már alacsony mikromoláris koncentrációban) is csökkentette a hyperglycemia által indukált szabadgyök termelést, és hatékonyabbnak bizonyult a dexametazonnál microvascularis endothel sejtekben. A mitokondriális membránpotenciált a dexametazon és a mifepriszton is normalizálta, mely hatás az uncoupling protein 2 (UCP2) expressziójának 10-szeres emelkedésével járt együtt, utalva arra, hogy microvascularis endothel sejtekben a UCP2 indukció felelős a szteroidok antioxidáns hatásáért.

A UCP2 siRNS-mediált csendesítése részlegesen gátolta a szteroidokra látható választ, és csökkentette a mifepriszton szabadgyök termelést gátló hatását. Önmagában is fokozta a UCP2 csendesítés a mitokondriális szuperoxid termelést. A csökkent UCP2 szint a mitokondriális membránpotenciál emelkedéséhez vezetett, és részlegesen gátolta a mifepriszton membránpotenciál normalizáló hatását. Összességében, ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy hyperglycemiás endothel sejtekben a UCP2 expresszió felelős a glükokortikoidok hatására kialakuló membránpotenciál, illetve szabadgyök termelés csökkenésért.

UCP2 indukciót követően emelkedett a “szétkapcsolt” proton visszaáramlás (“proton leak”) hyperglycemiás sejtekben, míg a UCP2 csendesítés csökkentette a szteroidok “proton leak”-fokozó hatását. Ezen eredmények azt támogatják, hogy a UCP2 expresszió farmakológiai módszerekkel is fokozható microvascularis endothel sejtekben, és ez változásokat okoz a sejtmetabolizmusban.

4.3.3. A mitokondriális H₂S-donor molekulák elektron donáció révén csökkentik a mitokondriális szabadgyök termelést

Az AP39 és az AP123, elnyújtott felszabadulású mitokondriális H₂S donor molekulák, melyek csökkentik a mitokondriális szabadgyök

termelést és csökkenést okoznak a sejt össz-szabadgyök termelésében is. A hyperglycemiától emelkedett mitokondriális membránpotenciált mindkét szer nanomoláris koncentrációban csökkentette. Az AP39 hatáserőssége nagyobb volt, mint az AP123-é, ami a magasabb szulfid felszabadító tulajdonságával állhat összefüggésben.

A hosszantartó hyperglycemia hatására lecsökkent energiaszintet mutató endothel sejtekben koncentráció-függően emelte az ATP szintet az AP39 és az AP123 is.

Az extracelluláris fluxus mérési eredményei azt mutatják, hogy a mitokondriális H_2S donorok javítják a kapcsolási hatékonyságot, és szignifikánsan csökkentik a “proton leak”-et, ami megmagyarázza az ATP koncentráció emelkedését változatlan oxigénfogyasztás mellett. Nem volt mérhető változás a sejtek anaerob anyagcseréjében, ami megerősíti hogy a vizsgált koncentrációkban a szerek nem gátolják a mitokondriális légzést.

Annak megerősítésére, hogy a mitokondriális H_2S donorok közvetlenül fokozzák az elektron transzfert, a légzési komplexek aktivitását vizsgáltuk (II./III. komplex assay-vel). Az I. komplexet rotenonnal, a IV. komplexet cianiddal blokkolva mértük a III. komplex aktivitását. Szubsztrátként szukcinátot alkalmaztunk, melyről az elektronokat a II. komplex ubiquinonra, majd arról a III. komplex citokróm C-re továbbítja. Mindkét H_2S donor koncentrációfüggően fokozta a III. komplex aktivitást (citokróm C redukciót) $2,5\ \mu M$ -os koncentrációig, ami azt támogatja, hogy a szerek közvetlenül befolyásolják a légzési lánc aktivitást. Feltételezzük, hogy a mitokondriális H_2S oxidációnak elektron donációval járó lépése (ami az elektronokat quinon-ra továbbítja a III. komplex szintjén) és az ezt követő oxigén fogyasztással járó lépés (a H_2S oxidáció későbbi lépése) szétválaszthatóan történik, és ezek a szerek így visszapótolhatják a légzési lánc “elvesztett elektronjait”.

Összhangban van ezzel, hogy, mások is detektálták, hogy a H_2S a légzési lánc elektron donoraként működhet. Megemlítenéd, hogy a mitokondriális H_2S donorok 1000-szer hatékonyabbak voltak, mint a korábban használt nem célzott H_2S donorok.

5. Következtetések

Jelen vizsgálatokkal olyan gyógyszer molekulákat azonosítottunk sejtes szűrővizsgálatot alkalmazva, melyek jótékonyan befolyásolják a hyperglycemiás endothel sejtek szabadgyök termelését. Ezek egyike az antidepresszáns hatású paroxetin, melyet a cukorbetegség szövődményeinek több *in vitro* és *in vivo* modelljében is vizsgáltunk. A paroxetin már szubmikromoláris koncentrációban hatásosnak mutatkozott, és mitokondriális hatásmechanizmusában szabadgyökfogó hatás játszik szerepet. Megjegyzendő, hogy a paroxetin jótékony hatását cardiovascularis betegségekben már korábbiakban is megfigyelték myocardialis infarctusban.

A glükokortikoid receptor antagonistá mifepriszton antioxidáns hatása mitokondriális szétkapcsoló hatással áll összefüggésben, melyet a UCP2 expresszió indukciójával ér el. Ez a szer is klinikailag releváns koncentráció tartományban bizonyult hatásosnak.

A mitokondriális elnyújtott felszabadulású H_2S donorok szintén védelmet biztosítottak a hyperglycemia által okozott hosszantartó oxidatív stresszel szemben endothel sejtekben. Ezek a szerek fokozták a légzési lánc III. komplexén az elektron transzfert és jótékonyan befolyásolták a sejtek bioenergetikáját. Már nanomoláris koncentráció tartományban pozitív hatással voltak, ami több mint két nagyságrenddel alacsonyabb, mint a maximálisan tolerálható koncentrációjuk, mely arra utal, hogy ezek biztonságosabbak, mint a nem mitokondriális (nem célzott) H_2S donor molekulák, illetve a természetes forrásai a hidrogén szulfidnak.

A jelen eredmények alapját képezhetik diabeteses betegekben későbbi tájékoztató klinikai vizsgálatoknak, melynek végső célja lehet, hogy egyes gyógyszerek, új indikációval, a cukorbetegség szövődményeinek kezelésére kerüljenek felhasználásra. Ezen tanulmányok ugyanakkor előzetes vizsgálatokat igényelnek, mely a szerek cukorbetegben mutatott biztonságosságát kell, hogy alátámassza.

6. Publikációk

A tézishoz közvetlenül kapcsolódó publikációk:

1. **Gero, D.**, P. Szoleczky, K. Suzuki, K. Modis, G. Olah, C. Coletta, and C. Szabo, *Cell-based screening identifies paroxetine as an inhibitor of diabetic endothelial dysfunction*. Diabetes, 2013. **62**(3): p. 953-64.
2. **Gero, D. *** and C. Szabo, *Glucocorticoids Suppress Mitochondrial Oxidant Production via Upregulation of Uncoupling Protein 2 in Hyperglycemic Endothelial Cells*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0154813.
3. Suzuki, K., G. Olah, K. Modis, C. Coletta, G. Kulp, **D. Gero**, P. Szoleczky, T. Chang, Z. Zhou, L. Wu, R. Wang, A. Papapetropoulos, and C. Szabo, *Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. 13829-34.
4. **Gero, D. ***, R. Torregrossa, A. Perry, A. Waters, S. Le-Trionnaire, J.L. Whatmore, M. Wood, and M. Whiteman, *The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro*. Pharmacol Res, 2016. **113**(Pt A): p. 186-198.

Könyvfejezetek:

5. **Gero, D. ***, *Hyperglycemia-induced endothelial dysfunction*, in *Endothelial Dysfunction*, H. Lenasi, Editor. 2018, IntechOpen. p. (in press).
6. **Gero, D. ***, *Cell-based Screening to Identify Cytoprotective Compounds*, in *Drug Discovery*, V. Bobbarala, Editor. 2018, IntechOpen. p. (in press).

Egyéb publikációk

7. Su, X., Q. Hu, J.M. Kristan, C. Costa, Y. Shen, **D. Gero**, L.A. Matis, and Y. Wang, *Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2523-32.
8. Beller, C.J., J. Kosse, T. Radovits, **D. Gero**, R. Krempien, M.L. Gross, I. Berger, S. Hagl, C. Szabo, and G. Szabo, *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition combined with irradiation: a dual treatment concept to prevent neointimal hyperplasia after endarterectomy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **66**(3): p. 867-75.
9. Beller, C.J., T. Radovits, J. Kosse, **D. Gero**, C. Szabo, and G. Szabo, *Activation of the peroxynitrite-poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase pathway during neointima proliferation: a new target to prevent restenosis after endarterectomy*. J Vasc Surg, 2006. **43**(4): p. 824-30.
10. **Gero, D.** and C. Szabo, *Role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in the pathogenesis of liver injury*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(23): p. 2903-10.
11. Kiss, L., M. Chen, **D. Gero**, K. Modis, Z. Lacza, and C. Szabo, *Effects of 7-ketocholesterol on the activity of endothelial poly(ADP-ribose) polymerase and on endothelium-dependent relaxant function*. Int J Mol Med, 2006. **18**(6): p. 1113-7.
12. Lacza, Z., E. Pankotai, A. Csordas, **D. Gero**, L. Kiss, E.M. Horvath, M. Kollai, D.W. Busija, and C. Szabo, *Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist?* Nitric Oxide, 2006. **14**(2): p. 162-8.
13. Molnar, A., A. Toth, Z. Bagi, Z. Papp, I. Edes, M. Vaszily, Z. Galajda, J.G. Papp, A. Varro, V. Szuts, Z. Lacza, **D. Gero**, and C. Szabo, *Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure*. Mol Med, 2006. **12**(7-8): p. 143-52.

14. Szabo, G., S. Bahrle, V. Sivanandam, N. Stumpf, **D. Gero**, I. Berger, C. Beller, S. Hagl, C. Szabo, and T.J. Dengler, *Immunomodulatory effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition contribute to improved cardiac function and survival during acute cardiac rejection*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(7): p. 794-804.
15. Szabo, G., N. Stumpf, T. Radovits, K. Sonnenberg, **D. Gero**, S. Hagl, C. Szabo, and S. Bahrle, *Effects of inosine on reperfusion injury after heart transplantation*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(1): p. 96-102.
16. Toth-Zsamboki, E., E. Horvath, K. Vargova, E. Pankotai, K. Murthy, Z. Zsengeller, T. Barany, T. Pek, K. Fekete, R.G. Kiss, I. Preda, Z. Lacza, **D. Gero**, and C. Szabo, *Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes*. Mol Med, 2006. **12**(9-10): p. 221-8.
17. **Gero, D.**, G. Kokeny, L. Rosivall, and M. Mozes, *C57BL6 genetic background reduced the progression of renal fibrosis in alb/TGF-beta1 transgenic mice*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2007. **22**: p. 103-104.
18. **Gero, D.**, K. Modis, N. Nagy, P. Szoleczky, Z.D. Toth, G. Dorman, and C. Szabo, *Oxidant-induced cardiomyocyte injury: identification of the cytoprotective effect of a dopamine 1 receptor agonist using a cell-based high-throughput assay*. Int J Mol Med, 2007. **20**(5): p. 749-61.
19. Radovits, T., L.N. Lin, J. Zotkina, **D. Gero**, C. Szabo, M. Karck, and G. Szabo, *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by reactive oxidant hydrogen peroxide in vitro*. Eur J Pharmacol, 2007. **564**(1-3): p. 158-66.
20. Radovits, T., L. Seres, **D. Gero**, I. Berger, C. Szabo, M. Karck, and G. Szabo, *Single dose treatment with PARP-inhibitor INO-1001 improves aging-associated cardiac and vascular dysfunction*. Exp Gerontol, 2007. **42**(7): p. 676-85.

21. Radovits, T., L. Seres, **D. Gero**, L.N. Lin, C.J. Beller, S.H. Chen, J. Zotkina, I. Berger, J.T. Groves, C. Szabo, and G. Szabo, *The peroxynitrite decomposition catalyst FP15 improves ageing-associated cardiac and vascular dysfunction*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(2): p. 173-81.
22. Radovits, T., J. Zotkina, L.N. Lin, T. Bomicke, R. Arif, **D. Gero**, E.M. Horvath, M. Karck, C. Szabo, and G. Szabo, *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by hypochlorite*. Experimental Biology And Medicine, 2007. **232**(9): p. 1204-1212.
23. Szabo, C., **D. Gero**, and G. Hasko, *Anti-inflammatory and cytoprotective effects of inosine*, in *Adenosine receptors : therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*, G. Haskó, B.N. Cronstein, and C. Szabó, Editors. 2007, CRC/Taylor & Francis: Boca Raton [Fla.]. p. 237-256.
24. Szijarto, A., E. Batmunkh, O. Hahn, Z. Mihaly, A. Kreiss, A. Kiss, G. Lotz, Z. Schaff, L. Vali, A. Blazovics, **D. Gero**, C. Szabo, and P. Kupcsulik, *Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status*. J Surg Res, 2007. **142**(1): p. 72-80.
25. Szijarto, A., O. Hahn, E. Batmunkh, R. Stangl, A. Kiss, G. Lotz, Z. Schaff, L. Vali, A. Blazovics, **D. Gero**, C. Szabo, P. Kupcsulik, and L. Harsanyi, *Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: Effects on microcirculation and antioxidant status in rats*. Clin Nutr, 2007.
26. **Gero, D.** and C. Szabo, *Poly(ADP-ribose) polymerase: a new therapeutic target?* Curr Opin Anaesthesiol, 2008. **21**(2): p. 111-21.
27. Horvath, E.M., R. Benko, **D. Gero**, L. Kiss, and C. Szabo, *Treatment with insulin inhibits poly(ADP-ribose)polymerase activation in a rat model of endotoxemia*. Life Sciences, 2008. **82**(3-4): p. 205-209.
28. Radovits, T., **D. Gero**, L.N. Lin, S. Loganathan, T. Hoppe-Tichy, C. Szabo, M. Karck, H. Sakurai, and G. Szabo,

- Improvement of aging-associated cardiovascular dysfunction by the orally administered copper(II)-aspirinate complex.* Rejuvenation Res, 2008. **11**(5): p. 945-56.
29. Lukovich, P., T. Vanca, **D. Gero**, and P. Kupcsulik, [*The development of laparoscopic technology in light of cholecystectomies performed between 1994 and 2007*]. Orv Hetil, 2009. **150**(48): p. 2189-93.
 30. Modis, K., **D. Gero**, N. Nagy, P. Szoleczky, Z.D. Toth, and C. Szabo, *Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis.* Br J Pharmacol, 2009. **158**(6): p. 1565-78.
 31. Ozsvari, B., L.G. Puskas, L.I. Nagy, I. Kanizsai, M. Gyuris, R. Madacsi, L.Z. Feher, **D. Gero**, and C. Szabo, *A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds.* Int J Mol Med, 2010. **25**(4): p. 525-30.
 32. Bartha, E., I. Solti, A. Szabo, G. Olah, K. Magyar, E. Szabados, T. Kalai, K. Hideg, K. Toth, **D. Gero**, C. Szabo, B. Sumegi, and R. Halmosi, *Regulation of kinase cascade activation and heat shock protein expression by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in doxorubicin-induced heart failure.* J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **58**(4): p. 380-91.
 33. Hegedus, V., **D. Gero**, Z. Mihaly, A. Szijarto, T. Zelles, and E. Sardi, [*Experimental food-induced fatty liver and its adjuvant therapy with natural bioactive substances*]. Orv Hetil, 2011. **152**(26): p. 1035-42.
 34. Olah, G., C.C. Finnerty, E. Sbrana, I. Elijah, **D. Gero**, D.N. Herndon, and C. Szabo, *Increased poly(ADP-ribosylation) in skeletal muscle tissue of pediatric patients with severe burn injury: prevention by propranolol treatment.* Shock, 2011. **36**(1): p. 18-23.
 35. Olah, G., K. Modis, **D. Gero**, K. Suzuki, D. Dewitt, D.L. Traber, and C. Szabo, *Cytoprotective effect of gamma-tocopherol against tumor necrosis factor alpha induced cell*

- dysfunction in L929 cells*. Int J Mol Med, 2011. **28**(5): p. 711-20.
36. Stangl, R., A. Szijarto, P. Onody, J. Tamas, M. Tatrai, V. Hegedus, A. Blazovics, G. Lotz, A. Kiss, K. Modis, **D. Gero**, C. Szabo, P. Kupcsulik, and L. Harsanyi, *Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment*. J Surg Res, 2011. **166**(1): p. 95-103.
 37. Szabo, G., G. Veres, T. Radovits, **D. Gero**, K. Modis, C. Miesel-Groschel, F. Horkay, M. Karck, and C. Szabo, *Cardioprotective effects of hydrogen sulfide*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 201-10.
 38. Coletta, C., A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Modis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, **D. Gero**, I. Sharina, E. Martin, and C. Szabo, *Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(23): p. 9161-6.
 39. Modis, K., **D. Gero**, K. Erdelyi, P. Szoleczky, D. DeWitt, and C. Szabo, *Cellular bioenergetics is regulated by PARP1 under resting conditions and during oxidative stress*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(5): p. 633-43.
 40. Szoleczky, P., K. Modis, N. Nagy, Z. Dori Toth, D. DeWitt, C. Szabo, and **D. Gero** *, *Identification of agents that reduce renal hypoxia-reoxygenation injury using cell-based screening: purine nucleosides are alternative energy sources in LLC-PK1 cells during hypoxia*. Arch Biochem Biophys, 2012. **517**(1): p. 53-70.
 41. **Gero, D.**, P. Szoleczky, K. Modis, J.P. Pribis, Y. Al-Abed, H. Yang, S. Chevan, T.R. Billiar, K.J. Tracey, and C. Szabo, *Identification of Pharmacological Modulators of HMGB1-Induced Inflammatory Response by Cell-Based Screening*. PLoS ONE, 2013. **8**(6): p. e65994.
 42. Modis, K., **D. Gero**, R. Stangl, O. Rosero, A. Szijarto, G. Lotz, P. Mohacsik, P. Szoleczky, C. Coletta, and C. Szabo, *Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in*

- vitro model of liver ischemia-reperfusion injury*. Int J Mol Med, 2013. **31**(2): p. 437-46.
43. **Gero, D.**, P. Szoleczky, A. Chatzianastasiou, A. Papapetropoulos, and C. Szabo, *Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)-mediated oxidative cell injury by ring finger protein 146 (RNF146) in cardiac myocytes*. Mol Med, 2014. **20**: p. 313-28.
 44. **Gero, D.** * and C. Szabo, *Salvage of nicotinamide adenine dinucleotide plays a critical role in the bioenergetic recovery of post-hypoxic cardiomyocytes*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(20): p. 4817-32.
 45. Olah, G., B. Szczesny, A. Brunyanszki, I.A. Lopez-Garcia, **D. Gero**, Z. Radak, and C. Szabo, *Differentiation-Associated Downregulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Expression in Myoblasts Serves to Increase Their Resistance to Oxidative Stress*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134227.
 46. Pribis, J.P. #, Y. Al-Abed, H. Yang#, **D. Gero**#, H. Xu, M.F. Montenegro, E.M. Bauer, S. Kim, S.S. Chavan, C. Cai, T. Li, P. Szoleczky, C. Szabo, K.J. Tracey, and T.R. Billiar, *The HIV protease inhibitor saquinavir inhibits HMGB1 driven inflammation by targeting the interaction of cathepsin V with TLR4/MyD88*. Mol Med, 2015.
 47. Yang, H., H. Wang, Z. Ju, A.A. Ragab, P. Lundback, W. Long, S.I. Valdes-Ferrer, M. He, J.P. Pribis, J. Li, B. Lu, **D. Gero**, C. Szabo, D.J. Antoine, H.E. Harris, D.T. Golenbock, J. Meng, J. Roth, S.S. Chavan, U. Andersson, T.R. Billiar, K.J. Tracey, and Y. Al-Abed, *MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling*. J Exp Med, 2015. **212**(1): p. 5-14.
 48. Ahmad, A., **D. Gero**, G. Olah, and C. Szabo, *Effect of endotoxemia in mice genetically deficient in cystathionine-gamma-lyase, cystathionine-beta-synthase or 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase*. Int J Mol Med, 2016.
 49. Druzhyna, N., B. Szczesny, G. Olah, K. Modis, A. Asimakopoulou, A. Pavlidou, P. Szoleczky, **D. Gero**, K.

- Yanagi, G. Toro, I. Lopez-Garcia, V. Myrianthopoulos, E. Mikros, J.R. Zatarain, C. Chao, A. Papapetropoulos, M.R. Hellmich, and C. Szabo, *Screening of a composite library of clinically used drugs and well-characterized pharmacological compounds for cystathionine beta-synthase inhibition identifies benzerazide as a drug potentially suitable for repurposing for the experimental therapy of colon cancer*. Pharmacol Res, 2016. **113**(Pt A): p. 18-37.
50. Rios, E.C., F.G. Soriano, G. Olah, **D. Gero**, B. Szczesny, and C. Szabo, *Hydrogen sulfide modulates chromatin remodeling and inflammatory mediator production in response to endotoxin, but does not play a role in the development of endotoxin tolerance*. J Inflamm (Lond), 2016. **13**: p. 10.
51. **Gero, D. ***, *The Hypoxia-Reoxygenation Injury Model*, in *Hypoxia*, J. Zheng and C. Zhou, Editors. 2017, InTechOpen. p. 47-71.
52. Lopez-Garcia, I.[#], **D. Gero**[#], B. Szczesny, P. Szoleczky, G. Olah, K. Modis, K. Zhang, J. Gao, P. Wu, L.C. Sowers, D. DeWitt, D.S. Prough, and C. Szabo, *Development of a stretch-induced neurotrauma model for medium-throughput screening in vitro: identification of rifampicin as a neuroprotectant*. Br J Pharmacol, 2018. **175**(2): p. 284-300.

* corresponding author/"utolsó" vagy felelős szerző

[#] egyenlő hozzájárulás/megosztott elsőszereplőség