

**A kinurénsav és szintetikus analógjainak életkorfüggő
neuromoduláló hatásának vizsgálata NMDA-indukálta
excitotoxicitással szemben egér agyszövetben *in vitro* és *in vivo*
kísérletekben**

Doktori értekezés

Balog Emma

Témavezető:

Dr. Kis Zsolt

egyetemi adjunktus

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem



2025

Szeged

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	4
3. Bevezetés	6
3.1. A kinurenin-útvonala	6
3.2. A kinureninek farmakológiája	7
3.3. A KYNA szerepe patológiás kórképekben	10
3.4. A KYNA kémiaiailag módosított analógjai	12
3.4.1. SZR72-es KYNA-analóg	12
3.4.2. SZR104-es KYNA-analóg	13
3.5. Glutamáterg neurotranszmisszió és receptorai	14
3.5.1. Excitotoxicitás	15
3.5.2. NMDA	16
4. Célkitűzések	18
5. Anyagok és módszerek	19
5.1. Állatok tartása	19
5.2. Neuromoduláló anyagok <i>in vitro</i> vizsgálata	19
5.2.1. Agyszövet-preparálás	19
5.2.2. Kis térfogatú inkubációs rendszer és inkubációs csoportok	19
5.2.3. Biokémiai vizsgálatok	20
5.2.4. Akutagyszelet-preparátumok újrametszése	20
5.2.5. Fluoreszcens immunhisztokémia	21
5.2.6. Szövettan kvantifikálás módszere	21
5.2.7. Krezilibolya-festés	21
5.2.8. Statisztikai módszerek	22
5.3. NMDA-indukálta excitotoxicitás <i>in vivo</i> vizsgálata	22
6. A kísérletekben való részvétel	24
7. Eredmények	25
7.1. Neuromoduláló anyagok <i>in vitro</i> vizsgálata	25
7.1.1. NMDA-indukálta excitotoxicitás-modell	25
7.1.2. NMDA-indukálta excitotoxicitás vizsgálata különböző korú állatok esetében	27
7.1.3. KYNA és analógjai neuromoduláló hatásának vizsgálata különböző korú állatok esetében	30
7.1.4. KYNA és analógjainak dózisfüggő hatásvizsgálata	33
7.2. NMDA-indukálta excitotoxicitás <i>in vivo</i> vizsgálata	36

8. Diskusszió	39
9. Következtetések	45
10. Köszönetnyilvánítás	47
11. Irodalomjegyzék	48
12. Összefoglaló	62
13. Summary	65
14. Tudományos közlemények listája	68

2. Rövidítések jegyzéke

$\alpha 7nAChR$	$\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptor
2-AA	antranilsav
3HAA	3-hidroxiantranilsav
3-HK	3-hidroxikinurenin
aCSF	mesterséges agy-gerincvelői folyadék
AD	Alzheimer-kór
AHR	aril-hidrokarbon receptor
ALS	amiotrófiás laterálszklerózis
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav receptor
CA	Ammon-szarv (cornu ammonis)
CNS	központi idegrendszer
CSF	agy-gerincvelői folyadék
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
GD	gyrus dentatus
Glu	glutamát
G-protein	guanin nukleotid-kötő fehérje
GRP35	G-protein-kapcsolt receptor 35
HAAO	3-hidroxi-antranilsav-dioxigenáz
HD	Huntington-kór
IDO	indolamin-2,3-dioxigenáz
i.p.	intraperitoneális
KAT	kinurenin-aminotranszferáz
KMO	kinurenin-monooxygenáz
KP	kinurenin-útvonal
KT	kis térfogatú
KYNA	kinurénsav
LDH	laktát-dehidrogenáz
L-KYN	L-kinurenin

mGluR	metabotróp glutamáterg receptor
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NDS	normál számár szérum
NFK	N-formil-kinurenin
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NMDAR	N-metil-D-aszpartát receptor
NR1	N-metil-D-aszpartát receptor 1-es alegysége
NR2	N-metil-D-aszpartát receptor 2-es alegysége
NT	nagy térfogatú
PB	foszfátpuffer
PBT	Triton X-100 tartalmú foszfátpuffer
PD	Parkinson-kór
PFA	paraformaldehid
PIC	pikolinsav
QPRT	kvinolénsav-foszforibozil-transzferáz
QUIN	kvinolénsav
ROS	reaktív oxigéngyökök
SM	szklerózis multiplex
SZR72	2-(2-N,N-dimetilaminoetilamin-1-karbonil)-1H-kinolin-4-on-hidroklorid
SZR104	N-(2-(dimetil-amino)-etil)-3-(morfolino-metil)-4-hidroxi-kinolin-2-karboxamid
TDO	triptofán 2,4-dioxigenáz
Trp	triptofán
XA	xanturénsav

3. Bevezetés

3.1. A kinurenin-útvonala

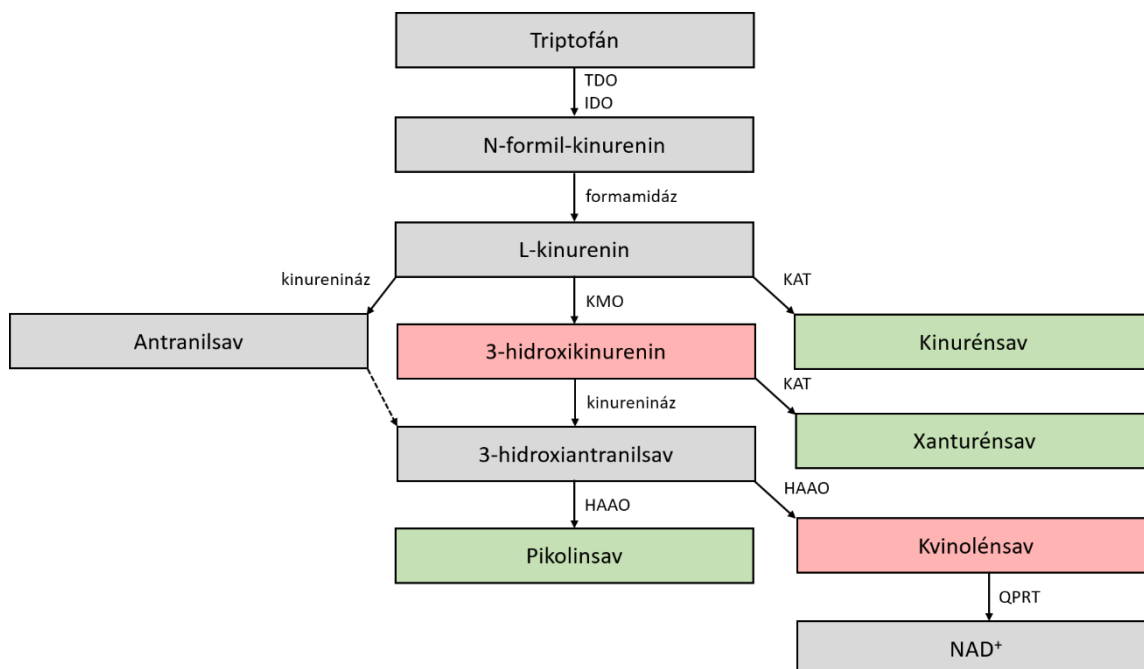
A triptofán (Trp) egy esszenciális aminosav, amelyet az állati szervezetek önmagában nem, vagy csak igen kis mennyiségben képesek előállítani. A Trp metabolizmusának fő útvonala az úgynevezett kinurenin-útvonala (KP) (**1. ábra**) (Stone and Darlington, 2002). Habár a Trp metabolizmusának egyik legismertebb bioaktív hatású anyagcsereterméke a szerotonin, ez mindössze 5%-át teszi ki ezen aminosav lebomlásának, Trp 95%-a a KP-n keresztül bomlik le (Platten et al., 2019; Tyce, 1990). A KP során számos neuroaktív metabolit keletkezik, amelyeket együttesen kinurenineknek nevezünk. A kinureninek hatása széles spektrumú, fiziológiai körülmények között szerepük lehet a sejt energianyerő folyamataiban, neurotranszmisszióban, immunválasz kialakításában, emellett különböző patológiai állapotokban betöltött szerepüket is leírták (Correia and Vale, 2022).

A KP első lépése a Trp N-formil-kinureninné (NFK) történő átalakulása, amelyet két enzim katalizál: a triptofán 2,4-dioxigenáz (TDO) és az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) (Sugimoto et al., 2006). Az NFK-t a formamidáz enzim L-kinureninné (L-KYN) alakítja (Török et al., 2020). Az L-KYN egy fontos elágazási pont, ahonnan a katabolizmus három irányban folytatódhat:

1. A kinurenin-aminotranszferáz (KAT) enzimek katalízise révén az L-KYN irreverzibilis transzaminációjával kinurénsav (KYNA) képződik. A KAT enzimek 4 izoformáját különböztethetjük meg (KAT-1-4), melyek közül a KAT-2 enzim játsza a legfontosabb szerepet a KYNA szintézisében humán és rágcsáló agyszövetben (Nematollahi et al., 2016). Korábbi kutatások azt bizonyították, hogy a KAT-2 enzim patkányok agyszövetében főként asztrocitákban expresszálódik cerebrum és cerebellum területén is (Guidetti et al., 2007). Kutatócsoportunk által közölt publikáció alapján elmondható, hogy egerekben nagyagy területén neuronok is képesek az enzim kifejezésére (Herédi et al., 2017). Csoportunk továbbá azt is leírta, hogy egér cerebellumban is expresszálódik a KAT-2 enzim neuronokban, azonban az asztrocitákban és mikrogliaokban nem jelenik meg (Balog et al., 2021).

2. A második útvonal az L-KYN antranilsavvá (2-AA) történő alakulása, mely folyamatot a kinurenináz enzim katalizálja (Prasher and Sharma, 2021).

3. A harmadik útvonal során az L-KYN előanyagból 3-hidrozikinurenin (3-HK) képződik kinurenin-monooxygenáz (KMO) által (Smith et al., 2016). A 3-HK-ből a KAT enzimek katalízisével xanturénsav (XA), vagy pedig a kinurenináz által 3-hidroxi-antranilsav (3HAA) képződik. Azonban az 2-AA nem specifikus hidroxilációjával is 3HAA keletkezik (Malina and Martin, 1996). A 3HAA-ból képződhet 3-hidroxi-antranilsav-dioxigenáz (HAAO) által neuroprotektív hatású pikolinsav (PIC) és neurotoxikus kinolénsav (QUIN) (Guillemin et al., 2005; Jones et al., 2013; Schwarcz et al., 2012). A Trp lebomlási folyamatának végén a QUIN-ből nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) képződik kvinolénsav-foszforibozil-transzferáz (QPRT) katalízisével, amely a sejtek életképességének fenntartásához nélkülözhetetlen (Joisten et al., 2021; Platten et al., 2019).



1. ábra: A Trp metabolizmusa, a KP fontosabb anyagcsere termékei és enzimei feltüntetésével. Zöld: neuroprotektív anyagcsere-termékek; piros: neurotoxikus anyagcsere-termékek (Erhardt et al., 2009 nyomán módosítva).

3.2. A kinureninek farmakológiája

Az 1970-es évek óta számos tanulmány alátámasztotta azt a felvetést, hogy a kinureninek befolyásolni képesek az agy egyes funkcióit (Schwarcz et al., 2012). A kinureninek részt vesznek a neurotransmisszió, a neuroinflammáció és az oxidatív stressz szabályozásában és koncentrációjuktól, illetve kölcsönhatásaiktól függően neuroprotektív vagy neurotoxikus hatásokat fejtenek ki (Vécsei et al., 2013). A KP

diszregulációját számos neurológiai és pszichiátriai rendellenesség patofiziológiájában azonosították, rámutatva az útvonal és metabolitjai egyensúlyának fontosságára (Maddison and Giorgini, 2015; Muneer, 2020). A kutatások előrehaladtával és a módszertani eszköztár fejlődésével a kinureninek farmakológiai modulációja ígéretes terápiás lehetőségként merül fel az agyi funkciók helyreállítását vagy optimalizálását célzó beavatkozások terén (Pocivavsek et al., 2024).

A 3-HK a KP egyik fontos metabolitja, mely neurotoxikus hatással rendelkezik. Reaktív oxigéngyökök (ROS) felszabadulását eredményezi, mely oxidatív stresszhez és sejthalálhoz vezet (Luo et al., 2025). A metabolit N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon (NMDAR) fejt ki toxikus hatását, szabadgyökök felszabadulását indukálja (Arteaga-Henriquez et al., 2021). A 3-HK-t összefüggésbe hozták memóriazavarokkal bipoláris zavarban és depresszióban szenvedők esetén (Platzer et al., 2017; Young et al., 2016).

A XA a KP szintén fontos anyagcsereterméke, mely a metabotróp glutamáterg receptorokat (mGluR) képes aktiválni, szerepe van a szinaptikus plaszticitásban és transzmisszóban (Fazio et al., 2017). A XA befolyásolja továbbá a glutamáterg neurotranszmissziót, valamint a dopamin leadást is (Maitre et al., 2024). A XA-nak fontos szerepe van a különböző pszichiátriai megbetegedésekben. Skizofrénia esetén neuroprotektív hatással rendelkezik és fontos biomarker lehet (Fazio et al., 2015). Antikonvulzív hatása révén alkalmas lehet epilepsziás görcsök kezelésére és az ezzel járó rohamok kontrollálására (Lapin, 1983).

A QUIN a KP egyik legfontosabb neurotoxikus hatású anyagcsereterméke, mely az NMDAR-okon fejt ki hatását, a sejtek Ca^{2+} -influxát növelve neuronális sejthalált indukál (Jhamandas et al., 2000). A QUIN továbbá ROS felszabadulását idézi elő, ami tovább súlyosbíthatja a neurodegeneratív megbetegedések patológiás folyamatait (Müller et al., 2005). A QUIN kettős szerepe, mint jelátviteli molekula és neurotoxin, fokozottan kiemeli a KP egyensúlyának kritikus jelentőségét, mivel annak diszregulációja súlyos következményekkel járhat (Guillemin, 2012).

A PIC a KP egyik neuroprotektív hatású metabolitja. Állatkísérletek alapján a QUIN részleges antagonistája, képes a QUIN-okozta rohamokat enyhíteni (Jhamandas et al., 2000). A PIC neuroprotektív hatása mellett immunfolyamatok modulálásában is részt vesz (Bosco et al., 2000).

KYNA a KP legfontosabb neuroprotektív metabolitja, melyet elsősorban az NMDAR endogén kompetitív antagonistájaként tartanak számon; a receptorok NR1-es alegységének glicin-kötő helyére kapcsolódik (Birch et al., 1988). Azonban a KYNA más NMDAR-kötőhelyekhez, továbbá nem-NMDAR-hoz is képes kötődni (**1. Táblázat**). Ezen kölcsönhatások alapvető jelentőségűek a neuronális ingerlékenység és a szinaptikus transzmisszió szabályozásában (Bagasrawala et al., 2016). A KYNA anatagonista hatását fontos kiemelni az NMDAR-ok sztrichnin-rezisztens kötőhelyének esetében, hiszen neuroprotektív hatását ezen keresztül fejt ki (Kessler et al., 1989). Továbbá a KYNA ismert tulajdonsága a Janus-arcú jellege is: különböző koncentrációkban alkalmazva a KYNA gátló és facilitáló hatással is rendelkezhet (Rózsa et al., 2008). Ezen hatását elsősorban az NMDA- és 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav (AMPA) receptorokon (AMPA) fejt ki. Prescott és munkatársai AMPAR-okon bizonyították a KYNA dóziszfüggő kettős hatását: mikromoláris koncentrációban gátló hatást fejt ki, míg nanomoláris koncentrációban fokozza a serkentő poszt-szinaptikus potenciálok keletkezését (Prescott et al., 2006). Bár a KYNA meghatározott koncentrációban igazoltan neuroprotektív hatással rendelkezik, a klinikumban terápiás szerként való alkalmazása egyelőre nem megoldott. Alkalmazásának fő limitáló tényezője, hogy csak csekély mennyiségben képes penetrálni a vér-agy gáton (BBB) (Fukui et al., 1991).

Receptor	KYNA hatása	Hivatkozás
NMDAR NR1 kötőhely	antagonista	(Birch et al., 1988)
NMDAR sztrichnin-inszenzitív kötőhely	antagonista	(Kessler et al., 1989)
$\alpha 7$ nAChR*	antagonista	(Albuquerque and Schwarcz, 2013)
*A közelmúltban megkérdőjeleződött		(Stone, 2020)
Aril-hidrokarbon (AHR)	agonista	(DiNatale et al., 2010)
G-protein-kapcsolt receptor 35 (GRP35)	agonista	(Wang et al., 2006)
AMPA	dózisfüggő kettős hatás	(Prescott et al., 2006)

1. Táblázat: Rövid összefoglaló a KYNA hatással bíró receptorairól és főbb kötőhelyeiről.

3.3. A KYNA szerepe patológiás kórképekben

A KYNA fiziológias körülmények között jelen van a központi idegrendszerben (CNS) – többek között az agy parenchimájában és az agy-gerincvelői folyadékban (CSF) –, valamint a perifériás szervekben és a vérplazmában is (Vécsei et al., 2013). Azonban a KYNA túl magas, vagy túl alacsony szintje is vezethet patológiás elváltozásokhoz a CNS-ben. A KYNA megváltozott szintjéhez neurodegeneratív és pszichiátriai kórképek egyaránt kapcsolódhatnak (Erhardt et al., 2009; Vécsei et al., 2013).

Alzheimer-kór (AD): Kutatások bizonyítják, hogy a KYNA-szintje jelentősen lecsökken a betegség lefolyása alatt a vérplazmában és a vörösvértestekben, azonban a KYNA szintézisét katalizáló enzimek aktivitása változatlan marad (Hartai et al., 2007). AD betegek esetében jelentős KYNA-szint csökkenést mértek a CSF-ban egészséges középkorú felnőttekhez viszonyítva (González-Sánchez et al., 2020), de az adatok ellentmondásosak, mert más kutatócsoportok emelkedett KYNA-szintet detektáltak (Heyes et al., 1992). Humán mintákon végzett további vizsgálatok szerint beteg nők esetében a KYNA-szintje szignifikánsan megnövekedik a CSF-ban, míg férfiak esetében ez a változás nem volt detektálható (Wennström et al., 2014). Kepplinger és munkatársai leírták, hogy egészséges egyéneknél a mért KYNA-szint a CSF-ban az életkor előrehaladásával fokozatosan nő, tehát nem csak a nem, hanem a kor is befolyásolja a KYNA-szintjét (Kepplinger et al., 2005). Különböző agyterületek vizsgálata során kiderült, hogy a nucleus caudatus és a putamen területén jelentősen megemelkedett a KYNA-szintje AD páciensek esetében, míg a hippokampusz, a cerebellum és a frontális kéreg területén kismértékű KYNA-szint emelkedés volt csak megfigyelhető (Baran et al., 1999).

Parkinson-kór (PD): PD kialakulásának korai szakaszában a gyulladásos faktorok emelkedése az agyszövetben megzavarja a KP-t; ez KYNA-szint csökkenéshez, így neuroprotektív hatásának elmaradásához, valamint a neurotoxikus hatású QUIN szintjének emelkedéséhez vezet. Ennek eredményeként gyulladásos folyamatok felerősödése figyelhető meg, ami utat nyit az excitotoxicitás, így a sejthalál kialakulásának (Chen and Geng, 2023). PD esetében a substantia nigra pars compacta területén változatlan KYNA/Trp arányt, továbbá a 3-HK jelentős emelkedését írták le, ami a dopaminerg neuronok oxidatív károsodását indukálja. KYNA-szint szignifikáns csökkenése figyelhető meg frontális kéreg és putamen területén is humán agyszövet

mintákban (Ogawa et al., 1992). Más agyterületeken, mint például a cerebellum, a nucleus caudatus és egyéb kortikális területeken a KYNA-szintjének csökkenése csak kis mértékben figyelhető meg PD betegek agyszövetében (Beal et al., 1992).

Huntington-kór (HD): HD-betegeknél jellemzően lecsökken a KYNA-szintje a CSF-ban, azonban más KP metabolitok (3-HK, QUIN) szintje szignifikánsan megemelkedik, ezzel a neurotoxicitás felé billentve az anyagcseretermékek egyensúlyát (Schwarcz et al., 2010). HD esetében főként a striatum és a cortex területén figyelhető meg nagymértékű KYNA-szint csökkenés (Beal et al., 1992; Harris et al., 1998). Fathi és munkatársai leírták, hogy a különböző neurodegeneratív megbetegedések esetében, beleértve a HD-t is, a Trp és lebomlási termékei a vérben is jelentős csökkenést mutatnak (Fathi et al., 2022), amit Stoy és munkatársai is igazoltak (Stoy et al., 2005).

Amiotrófiás laterálszklerózis (ALS): Alarcan és munkatársai bizonyították, hogy ALS-es páciensekből származó CSF-ban a KYNA és egyéb KP metabolitok szintje nem változik egészséges egyénekhez képest a betegség korai szakaszában (Alarcan et al., 2021). Azonban egy másik kutatócsoport eredményei azt mutatták, hogy a CSF-ban szignifikánsan megemelkedik a KYNA-szintje, bár szérumban ennek ellenkezője figyelhető meg egészséges egyénekhez viszonyítva (Ilzecka et al., 2003).

Szklerózis multiplex (SM): Kutatások bizonyítják, hogy SM-betegek CSF-ában a KYNA-szintje fluktuál: szignifikánsan lecsökkent a betegség korai strádiumában, az akut fázisban azonban megemelkedik (Hartai et al., 2005; Rejdak et al., 2007). Kepplinger és munkatársai vizsgálatai szintén ezt a jelenséget igazolták (Kepplinger et al., 2005). SM-betegeknél a CSF mellett a szérumban is jelentősen megemelkedik a KYNA-szintje, valamint a QUIN/KYNA arány is (Fathi et al., 2022).

Iszkémiás stroke: Cogo és munkatársai állatkísérletei bizonyították, hogy kiváltott iszkémiás stroke után a QUIN/KYNA arány a QUIN felé tolódik, ezzel erősítve a neurotoxikus hatást (Cogo et al., 2021). A KYNA-szint jelentős csökkenését másik tanulmányban is leírták (Mo et al., 2014). Humán szérumban azonban a KYNA megemelkedett szintje volt a jellemző, ami a stroke után 24 órával már mérhető volt (Urbańska et al., 2006).

Depresszió: Depresszióval diagnosztizált páciensek vérében a KYNA-szintje jelentős csökkenést mutat egészséges egyénekhez viszonyítva. A QUIN-szintje azonban szignifikánsan magasabb koncentrációban mérhető (Nikkheslat et al., 2015; Savitz et al.,

2015). Erhardt és munkatársai igazolták, hogy depressziós egyének a CSF-ában a KYNA-szintje nem változik, de a QUIN/KYNA arány megnő (Erhardt et al., 2013). *Post-mortem* humán agykéreg mintákból csökkent KYNA-szintet mértek depressziós egyéneknél (Clark et al., 2016).

Skizofrénia: Skizofréniában szenvedő páciensek agykérgéből *post-mortem* mért értékek alapján elmondható, hogy a KYNA és egyéb KP-metabolitok (3-HK, ANA) szintje megnő a fehér- és szürkeállományban is (Antenucci et al., 2024). CSF-ban szintén megemelkedett szinteket detektáltak (Linderholm et al., 2012), valamint a szérum vizsgálata is hasonló eredményeket hozott (Yang et al., 2022).

HIV: HIV-1-fertőzöttek esetében a pszichiátriai megbetegedésekhez hasonlóan szintén megemelkedett KYNA-szint volt mérhető a CSF-ban. Leírták továbbá, hogy HIV-1-fertőzött nők esetében ez a szint szignifikánsan magasabb, mint a szintén fertőzött férfiakban (Atlas et al., 2007).

3.4. A KYNA kémiaiailag módosított analógjai

A KYNA (**2. táblázat**) igazoltan neuroprotektív hatással rendelkezik, így potenciálisan alkalmazható lenne neurodegeneratív kórképek kezelésében. Szisztémásan adagolva azonban korlátozott hatékonyságú, mivel csak csekély mértékben képes penetrálni a BBB-on (Nagy et al., 2011; Vécsei et al., 2013). Erre megoldást jelenthetnek a különböző gyógyszerszállító stratégiák (pl. nanopartikulumok), illetve a szintetikus KYNA-analógok alkalmazása is (Fülöp et al., 2009; Hornok et al., 2022). Számos kémiaiailag módosított KYNA-analóg áll jelenleg is tesztelés alatt, amelyek a KYNA-hoz hasonló neuroprotektív hatással rendelkeznek, azonban nagyobb arányban jutnak át a BBB-on és kedvezőbb farmakokinetikával rendelkeznek (Vécsei et al., 2013). Leghatékonyabb neuroprotektív hatású analógoknak a KYNA-amidokat tartják, melyek pozitív hatásait és hatékonyabb BBB-permeabilitását több állatkísérletben bizonyították (Gellért et al., 2012; Veres et al., 2017).

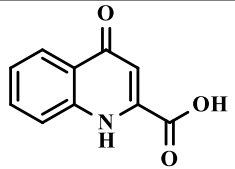
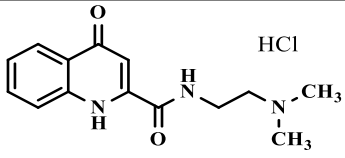
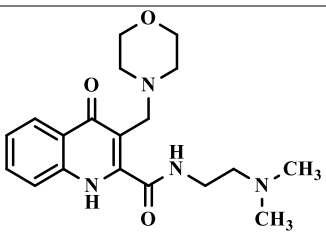
3.4.1. SZR72-es KYNA-analóg

Az egyik legígéretesebb szintetikus KYNA-amid-származék a 2-(2-N,N-dimetilaminoetilamin-1-karbonil)-1H-kinolin-4-on-hidroklorid (SZR72) (**2. táblázat**), amely imitálja a KYNA NMDAR-on kifejtett antagonistá hatását (Fülöp et al., 2009; Kassai et al., 2015). Kimutatták továbbá, hogy az analóg képes opioid receptorokon is

hatást kifejteni anélkül, hogy direkt módon kötődne ahhoz, ezáltal módosítva a guanin nukleotid-kötő fehérjékkel (G-protein) kapcsolt szignalizációs útvonalakat (Samavati et al., 2017). Ismert az is, hogy az SZR72-es analóg a KYNA-hoz képest hidrofílebb, így nagyobb arányban képes penetrálni a BBB-on (Hornok et al., 2022; Knyihar-Csillik et al., 2008). Az analóg pozitív hatásait számos állatmodellben igazolták az elmúlt évtizedekben. Az SZR72-kezelés szupresszálta az akut hasnyálmirigy-gyulladás okozta granulocita-aktivációt (Balla et al., 2021). Szeptikus modellben bizonyították még a mitokondriális funkciók és mikrocirkuláció helyreállításában mutatott pozitív hatását (Juhász et al., 2020), valamint protektívnek bizonyult szepszis-asszociált neutrofil-aktiváció és mitokondriális diszfunkció esetén is (Poles et al., 2021). Migrén modellben, a Complete Freund-adjuváns és nitroglicerinnel indukált c-Fos expressziót a trigeminális nucleus caudalisban az SZR72-kezelés jelentősen csökkentette (Knyihar-Csillik et al., 2008; Lukács et al., 2017). Iszkémiás modellben előkezelésként adva és a reperfüziós fázisban is jelentős neuroprotektív hatását írták le (Gellért et al., 2011). Újszülöttkori aszfixiás állatmodellben igazolták, hogy az SZR72 fokozza a neuronális aktivitást a reventilláció során, azonban a neuronális sejthalált nem volt képes csökkenteni (Kovács et al., 2021).

3.4.2. SZR104-es KYNA-analóg

Egy másik BBB permeábilis KYNA-analóg az N-(2-(dimetil-amino)-etil)-3-(morfolino-metil)-4-hidroxi-kinolin-2-karboxamid (SZR104) (**2. táblázat**) (Molnár et al., 2021). Irodalmi adatok alapján elmondható, hogy az SZR104 hatásmechanizmusa nagyon hasonló a KYNA-éhoz, gátló hatását feltehetően az NMDAR-ok sztrichnin-inszenzitív glicinkötő helyeihez kötődve fejt ki (Demeter et al., 2012). Az SZR104 pozitív hatását számos állatkísérletben bizonyították. Gyulladásos modellben anti-inflammatorikus hatással rendelkezett, gátolta a mikroglia és fagocita aktivációt (Lajkó et al., 2020; Szabo et al., 2023). Poles és munkatársai intraabdominális szepszis modellben bizonyították, hogy az SZR104 képes csillapítani a leukocita aktivációt és csökkenteni a mitokondriális diszfunkciót (Poles et al., 2021). Az analóg protektívnek bizonyult pentiléntetrazol-indukálta epileptiform rohamokkal szemben is (Demeter et al., 2012).

KYNA	
SZR72	
SZR104	

2. Táblázat. A KYNA, SZR72 és SZR104 szerkezeti képletei.

3.5. Glutamáterg neurotranszmisszió és receptorai

A glutamát (Glu) egy nem esszenciális aminosav, az emlősök CNS-ében a fő serkentő neurotranszmitter. Abnormális körülmények között azonban neurotoxiként funkcionálhat (Brosnan and Brosnan, 2013). Fiziológiás körülmények között neurotranszmitterként nélkülözhetetlen például tanulás és memória folyamatokban (McEntee and Crook, 1993), valamint a szinaptikus plaszticitás fenntartása szempontjából is alapvető fontosságú (Tapiero et al., 2002). Emellett a neuronális differenciáció, migráció és túlélés folyamata is szorosan kötődik a Glu-hoz (Jansson et al., 2013; Lu et al., 2020). Koncentrációja a sejtekben fiziológiásan millimólos nagyságrendű (2-20 mM), excitotoxicitás szempontjából a sejtek közötti térben megfigyelhető koncentrációja számottevő (Baker et al., 2003; Mangia et al., 2012). Nyugalmi állapotban extracellulárisan a Glu koncentrációja meglehetősen alacsony (1-10 μ M) (Herman and Jahr, 2007). Ez az alacsony koncentráció szükséges a megfelelő szinaptikus transzmisszió fenntartásához, ugyanakkor lehetővé teszi a Glu szintjének gyors változását a szinaptikus aktivitás alatt anélkül, hogy excitotoxikus hatásokat okozna (Sheldon and Robinson, 2007). Neurotranszmisszió során ez a koncentráció szignifikánsan megemelkedik: 100 μ M-tól több millimólig is terjedhet az extracelluláris tér Glu koncentrációja (Clements et al., 1992; Herman and Jahr, 2007).

A Glu a metabotróp és az ionotróp receptorokon keresztül fejti ki serkentő hatását. A metabotróp Glu receptorok (mGluR) G-protein kapcsoltak, vagy pedig G-protein független módon aktiválnak jelátviteli útvonalakat (Ribeiro et al., 2017). Az ionotróp receptorok ligand-aktivált ioncsatornák, melyhez az NMDA-, az AMPA- és a kainát receptorok tartoznak (Stroebe et al., 2021). Az értekezés szempontjából a Glu-receptorok közül a legfontosabb az NMDAR, mivel a neuronális plaszticitáson kívül a Glu-indukálta excitotoxicitás folyamatában is alapvető fontosságú (Vyklícký et al., 2014). Az NMDA-receptorok 7 alegység (NR) különböző kombinációiból épülhetnek fel (NR1, NR2A-D, NR3A-B), melyek különböző farmakológiai tulajdonságokkal rendelkezhetnek és befolyásolják a fiziológiai szerepüket (Hansen et al., 2018). A NR2A és NR2B alegységeknek rendkívül fontos szerepe van a kognitív folyamatok alakulásában, a szinaptogenezisben, azonban a különböző neurodegeneratív megbetegedések kulcsfontosságú pontjai is lehetnek (pl. AD, PD) (Gambrill and Barria, 2011; Ladagu et al., 2023).

3.5.1. Excitotoxicitás

Az excitotoxicitás egy kóros folyamat, amely elsősorban a Glu-receptorok, főként az NMDAR és az AMPAR-ok túlzott aktivációjához köthető, és neuronok károsodáshoz és pusztuláshoz vezet (Choi, 2020). Ez a jelenség akkor alakul ki, amikor a sejtek közötti térben túlzott mértékben halmozódik fel a Glu, ami nagymennyiségű Ca^{2+} beáramlását eredményezi a posztszinaptikus sejtekbe (Choi, 1987). Az excitotoxicitás molekuláris mechanizmusai közé tartozik az anyagcsere-folyamatok zavara, az oxidatív stressz, valamint a sejthalál (apoptózis és nekrozis) aktivációja (Acharyya et al., 2022; Young et al., 2004).

Az excitotoxicitás központi szerepet tölt be számos neurodegeneratív betegség patomechanizmusában: jelentős mértékben hozzájárul olyan kórképek progressziójához, mint az AD, PD, HD, SM és ALS (Granzotto et al., 2020).

AD-ban az excitotoxicitás a szinaptikus résben megnövekedett Glu-szint és a Glu-receptorok dinamikájának megváltozása következményeként alakul ki. Általa a kortikális és szubkortikális neuronok túlzott érzékenysége oxidatív stresszhez és neuronális károsodáshoz vezet (Zádori et al., 2018). Ezt a folyamatot az amiloid-béta plakkok jelenléte súlyosbítja, mivel fokozódik a Glu leadása a szinaptikus résbe, ugyanakkor a különböző pufferelő funkciók defektusa is fennáll (Fang et al., 2005). Az egyensúly

felborulása, különösen a szinaptikus és extraszinaptikus NMDAR aktivitás között, jelentős mértékben hozzájárul a kognitív hanyatlás progressziójához (Zádori et al., 2018).

A PD-ban a substantia nigra pars compacta dopaminerg neuronjainak pusztulása a túlzott Glu-leadás következménye, amelyet az oxidatív stressz súlyosbít. A neuroinflammáció fokozza a Glu toxikus hatásait, növelve a neuronális érzékenységet (Kamal et al., 2020).

HD-ban az NMDAR-ok túlzott aktiválása Ca^{2+} túlterhelést, mitokondriális diszfunkciót és oxidatív károsodást eredményez, ami neuronális apoptózishoz vezet (Granzotto et al., 2020).

A SM esetében az excitotoxicitás az oligodendrocitákra és a neuronok axonjaira gyakorol negatív hatást, ahol a gyulladásos környezet fokozza a Glu felszabadulását, ami demielinizációhoz és neuronális károsodáshoz vezet. Továbbá a Glu transzporterek működésének zavara a betegség fellángolásakor tovább fokozza az excitotoxikus hatásokat (Bannerman et al., 2007).

ALS-ban a motoros neuronok excitotoxicitásra mutatott érzékenysége jelentős, különösen az alsó motoneuronokban, a sejtekbe áramló nagy mennyiségű Ca^{2+} azok degenerációját eredményezi (Blizzard et al., 2015).

3.5.2. NMDA

Az NMDA egy szintetikus aminosavszármazék, amely szelektív agonistaként hat az NMDAR-on. Hatása receptorszinten hasonló a Glu-hoz, de kizárólag az NMDAR-okra hat. Szelektivitása miatt az NMDA-t gyakran alkalmazzák a kísérletes excitotoxicitás kiváltására (Lambuk et al., 2017; Vyklický, 1993). Az NMDA hatását nagyban befolyásolja az alkalmazott dózisa: minél nagyobb a koncentrációja, annál nagyobb sérülést válthat ki, valamint hatása függ a vizsgált kísérleti állatok életkorától is (Kim et al., 2019; Zhou and Baudry, 2006).

Az NMDA-indukálta excitotoxicitást számos különböző állatmodellben vizsgálták: Zhou és munkatársai patkány akutagyszelet-preparátumokon vizsgálták különböző korú állatok esetében (Zhou and Baudry, 2006). Caviedes és munkatársai leírták, hogy hippocampális sejt kultúrákban a magas dózisban (100 μM) adott NMDA jelentős mértékű sejthalált idéz elő (Caviedes et al., 2021). Ogita és munkatársai NMDA-val történő előkezelés jótékony hatását bizonyította egereken *in vivo* kainát-indukálta

excitotoxicitással szemben (Ogita et al., 2003). Patkányok esetében bizonyították, hogy az NMDA nem csak a retinát, hanem a látóideget is jelentősen károsítja; retina ganglionsejtjeinek elhalásához vezethet glaukóma esetén (Lambuk et al., 2017).

Irodalomban fellelhető korábbi vizsgálatok alapján elmondható, hogy az NMDA-indukálta excitotoxicitás-modellek alkalmasak a KYNA és kémiaiilag módosított analógjainak vizsgálatára. Ezért kutatómunkánk során munkacsoportunk is ezt az anyagot választotta kísérleti modelljében.

4. Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka fő célja a különböző neuromoduláló anyagok vizsgálata NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben *in vitro* és *in vivo* körülmények között C57Bl/6 egerek agyszövetében.

Célkitűzés 1.

Excitotoxicitás-modell létrehozása, a megfelelő NMDA-koncentráció meghatározása és alkalmazása **különböző korú egerek** agyából készített akutagyszelet-preparátumok esetén, kis térfogatú inkubációs rendszerben.

Célkitűzés 2.

KYNA és analógjai (SZR72 és SZR104) neuromoduláló hatásának vizsgálata NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben akutagyszelet-preparátumok esetén **különböző korú** állatcsoportoknál, kis térfogatú inkubációs rendszerben.

Célkitűzés 3.

KYNA és analógjai (SZR72 és SZR104) hatásának vizsgálata **dózisfüggő módon fiatal felnőtt** állatok esetében, kis térfogatú inkubációs rendszerben.

Célkitűzés 4.

Excitotoxicitás vizsgálata *in vivo* módszerrel, intraperitoneálisan beadott NMDA-kezelés után **különböző korú egerek** esetében.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Állatok tartása

A kísérleteink során különböző korú (1-, 4-, 8 hetes és 1 éves) 5-30 grammos, hím C57BL/6 egereket használtunk (n=199). Az állatokat műanyag ketrecben tartottuk, az egerek az ivóvízhez és a táplálékhoz szabadon hozzáférhettek. Az állatházban állandó hőmérsékletet (24 °C) biztosítottunk, valamint a cirkadián ritmus fenntartásához 12-12 óra világos és sötét periódusok váltották egymást. Kísérleteink során a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai Közösség Tanácsának 2010. évi rendeletét (2010/63/EU) betartottuk. A kísérletek elvégzéséhez szükséges etikai engedély száma: XX. /495/2024.

5.2. Neuromoduláló anyagok *in vitro* vizsgálata

5.2.1. Agyszövet-preparálás

Az állatokat izoflurán gázzal (3%) altattuk, majd dekapitáltuk (NEMI Guillotine Braintree Scientific, Inc.), és az agyukat eltávolítottuk a koponyából. Az agyukból 350 µm vastagságú koronális metszeteket készítettünk vibratóm segítségével (Leica VT1200S, Németország). A metszést hideg (4 °C), mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (aCSF) végeztük, melynek összetétele (mM-ban): 234 szacharóz, 3.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄ és 10 D-glükóz. Az aCSF oldatot folyamatosan oxigenáltattuk karbogen gáz (95% O₂, 5% CO₂) segítségével. A szöveteket 30 percig inkubáltuk oxigenizált nagy térfogatú (NT), standard (300 ml aCSF, 20 °C) inkubációs rendszerben, melynek összetétele (mM-ban): 130 NaCl, 3.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1,5 CaCl₂, 3 MgSO₄ és 10 D-glükóz.

5.2.2. Kis térfogatú inkubációs rendszer és inkubációs csoportok

A NT-inkubációt követően az akutagyszelet-preparátumokat különböző neuromoduláló anyagokkal kezeltük egy, a kutatócsoportunk által létrehozott kis térfogatú (KT) inkubációs rendszerben (Herédi et al., 2019): 3 teljes koronális akutagyszelet-preparátumot helyeztünk 6 ml aCSF-ba, majd 4 órán át inkubáltuk 32 °C-on. Ebben a rendszerben mérhetővé váltak a kis koncentrációban felszabaduló anyagok.

Az excitotoxicitás-modell felállításához az NMDA-t (Sigma-Aldrich) a szakirodalomban fellelhető adatok alapján négy különböző koncentrációban vizsgáltuk (10, 25, 50 és 100 μM), melyet kezeletlen, kontroll csoporttal vetettünk össze. A kísérletsorozatba összesen 24 fiatal felnőtt (8-10 hetes) állatot ($n=24$) vontunk be, csoportonként 4-5 állat felhasználásával. Egy állat agyából 2 egymással párhuzamos kísérletet végeztünk el: egy kontroll- és egy vizsgálandó NMDA-koncentrációt. Ezen kísérletek alapján 10 μM NMDA-kezelést alkalmaztunk az excitotoxicitás korfüggő hatásának vizsgálatához, ezen kísérletekhez korcsoportonként 6-6 állatot ($n=24$) használtunk fel. Korábbi vizsgálataink alapján a KYNA *de novo* 40 nM koncentrációban keletkezett egy 4 órás inkubáció során rendszerünkben, ezért ezt a koncentrációt választottuk a KYNA (Sigma-Aldrich) és analógjai neuromoduláló hatásának vizsgálatához a 10 μM NMDA-indukálta excitotoxicitás-modellben. A KYNA-t 1M NaOH-ban, míg az SZR72 és SZR104-es analógokat aCSF-ban oldottuk fel. Kísérleteink során ugyanazon anyagokkal dolgoztunk, amelyet csoportunk korábbi közleményében is használt (Fehér et al., 2019). Minden korcsoport esetében 12-12 állat ($n=48$) bevonásával végeztük el a kísérleteket. A KYNA és analógjai dózisfüggő hatásvizsgálatához az anyagokat növekvő koncentrációban (20, 40, 100, 500 nM és 8 μM) alkalmaztuk 10 μM NMDA-kezeléssel szemben. 5-5 fiatal felnőtt (8-10 hetes) állat agyából ($n=75$) származó agyszeleteket használtunk fel az egyes dózisok esetén KYNA és analógjai vizsgálatához. A felülúszót felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

5.2.3. Biokémiai vizsgálatok

A KT rendszerből vett felülúszóból laktát-dehidrogenáz (LDH) szint meghatározást végeztünk a szöveti károsodás mértékének megállapítására. Az enzimkoncentrációkat LDH-aktivitásmérő reagens-csomaggal (DGKC módszerek) 340 nm-en és $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (Diagnosticum Ltd., Magyarország) és Biolis 24i Premium Clinical Biochemical System (Tokyo Boeki) rendszerrel határoztuk meg. Az LDH-aktivitást U/l/100 mg szövet értékben fejeztük ki, az inkubáció során a rendszerünkből történő párolgást is figyelembe véve, a kapott értékeket ezzel normalizálva.

5.2.4. Akutagyszelet-preparátumok újrametszése

Hisztológiai vizsgálatainkhoz 2-2 akutagyszelet-preparátumot egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltunk. Másnap először foszfátpufferben (PB) mostuk, majd krioprotekció céljából először 15%-os, azután 30%-os szacharóz oldatban

inkubáltuk az agyszöveteket. A mintákat felhasználásig 30%-os szacharóz oldatban -20 °C-on tároltuk. Végül 35 µm vastagságú szeleteket készítettünk fagyasztó mikrotóm segítségével (Reichert-Jung 1206).

5.2.5. Fluoreszcens immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz egy általános neuronális markert, a NeuN-t használtuk. A metszést követően az agyszöveteket 0,4%-os Triton X-100-at tartalmazó PB-ben (PBT) mostuk. A háttérfestődés megelőzése érdekében a szövetmintákat nem-konjugált Fab-fragmens (Jackson ImmunoResearch) pre-inkubációval blokkoltuk. Ezután a szövetmintákat PBT-ben mostuk, majd 1 órán keresztül 2%-os normál szamar szérumban (NDS) inkubáltuk a nonspecifikus kötődések kiküszöbölése érdekében. Blokkolást követően a szövetmintákat egy éjszakán át 4 °C-on elsődleges antitestet tartalmazó oldatban: egér anti-NeuN, 1:4000 (Abcam) és 1% NDS-t tartalmazó PBT-ben inkubáltuk.

Másnap a szövetmintákat 0,4%-os PBT-ben mostuk, majd pedig 2 órán át szobahőmérsékleten fluorofórral kapcsolt szekunder antitestben (anti-egér AlexaFluor 488, Jackson ImmunoResearch, 1:500) inkubáltuk és ~519 nm hullámhosszon vizsgáltuk. A szöveteket tárgylemezre húztuk, majd vízbázisú fedőanyaggal (ProLong® Gold, Life Technologies) fedtük le.

5.2.6. Szövettan kvantifikálás módszere

Hisztológiai vizsgálataink kvantifikálásához az ImageJ szoftvert használtuk a sejtsorok NeuN immunreaktivitásának meghatározására. A vizsgálatot *in vitro* rendszerből származó szövetek esetében a hippocampusz Ammon-szarvának (cornu ammonis, CA) CA1-es régiójában egy 250 µm² méretű kijelölt területen végeztük el és százalékosan ábrázoltuk. Csoportonként 3-6 agyszövetet vizsgáltunk.

5.2.7. Krezilibolya-festés

Az NMDA-indukálta sejthalál meghatározására krezilibolya-festést alkalmaztunk. A metszeteket először leszálló alkoholsorral (100, 70, 50%), majd 0,1%-os krezilibolya-festéssel (Sigma) kezeltük. Ezután felszálló alkoholsorral (50, 70, 100%) rehidratáltuk a szövetmintákat, majd xilolba helyeztük. A tárgylemezeket DPX fedőanyaggal fedtük le.

Vizsgálatainkat a hippocampusz CA1-es és CA3-as régiójának piramis sejtsorán végeztük el. A mintákat mindkét esetben Zeiss Axio Imager 2 mikroszkóppal vizualizáltuk.

5.2.8. Statisztikai módszerek

Az adatokat OriginPro 8.6 szoftverrel ábráztuk. Minden statisztikai számítást a Jamovi statisztikai szoftverrel végeztünk. A csoportok közötti variancia homogenitását a hibavarianciák egyenlőségének Levene-tesztje segítségével vizsgáltuk. Az adatok eloszlását a normalitás szempontjából Shapiro-Wilk próbával teszteltük. A statisztikai szignifikanciát faktoriális ANOVA segítségével számítottuk ki. Tukey post hoc tesztet használtunk a csoportátlag párok közötti különbségek szignifikanciájának megállapítására.

5.3. NMDA-indukálta excitotoxicitás *in vivo* vizsgálata

Az *in vitro* körülmények között végzett kísérleteink alapján az *in vivo* excitotoxicitás vizsgálathoz két különböző korú állatcsoportot választottunk: 2-4 és 8-10 hetes C57Bl/6 egereket. Csoportonként 7-7 állaton végeztük el a kísérleteket (n=28).

Az *in vivo* vizsgálatokhoz 75 mg/ttkg NMDA-t injektáltunk intraperitoneálisan (i.p.) 0,9 %-os fiziológiás sóoldatban oldva, kontroll csoportként szintén fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk 20 ml/ttkg volumenben. Az oltást követően az állatokat folyamatos megfigyelés alatt tartottuk, állatjólléti monitorozási pontrendszert alkalmazva. Az állatok jóllétét a kísérlet elején 2 óránként, később az oltás okozta viselkedésbeli eltérések mérséklődésével 8 óránként ellenőriztük. A pontrendszer elemei: a szőrzet állapota, testtartás, mozgékonyág, ijedségi reflex, testsúly és hőmérséklet ellenőrzése, valamint a farokrágás bizonyos állatcsoportok esetében, ezért ennek megléte vagy hiánya is vizsgálati szempont. A kísérlet az oltástól számított 24. órában ért véget.

Az oltást követő 24. órában az állatoknak i.p. 25%-os uretánt (1,6g/ttkg) injektáltunk, ezután transzkardiális perfúziót végeztünk először 4 °C-os PBS-rel, majd pedig 4%-os PFA oldattal. Ezután az agyukat eltávolítottuk a koponyából és egy éjszakán át immerziósan is fixáltuk. Ezt követően az agyakból vibratóm (Leica VT1000S) segítségével 35 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket a korábban ismertetett metodikák segítségével krezilibolya-festést és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Immunjelöléshez az alábbi elsődleges antitesteket használtuk:

NeuN 1:4000 (Abcam); GFAP 1:1000 (Millipore), szekunder antitest a NeuN-jelölés esetén anti-egér AlexaFluor 488 (1:500) volt, amelyet ~519 nm hullámhosszon vizsgáltunk, a GFAP-jelöléshez anti-nyúl Cy3 antitestet (1:500) alkalmaztunk és ~570 nm-en detektáltuk. A sejtmag jelöléséhez egy lépéses reakcióban 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) alkalmaztunk (1:1000), melyet ~461 nm hullámhosszon vizsgáltunk mikroszkópos technikával. A hippocampusz CA1, CA3, CA4 és gyrus dentatus (GD) területeit Zeiss Axio Imager 2 mikroszkóppal vizualizáltuk.

6. A kísérletekben való részvétel

A kísérletes munka során az alábbi vizsgálatokat végeztem el:

- *in vitro* kísérletek előkészítése és kivitelezése
- *in vivo* kísérletek előkészítése és kivitelezése
- szövetpreparálás hisztológiai vizsgálatokhoz
- krezilibolya-festés
- fluoreszcens immunhisztokémia
- mikroszkópos felvételek készítése
- adatelemzés.

Az LDH-szint meghatározását Magyariné Dr. Berkó Anikó végezte el.

A KYNA-analógok szintetizálását Dr. Lőrinczi Bálint és Dr. Szatmári István végezték.

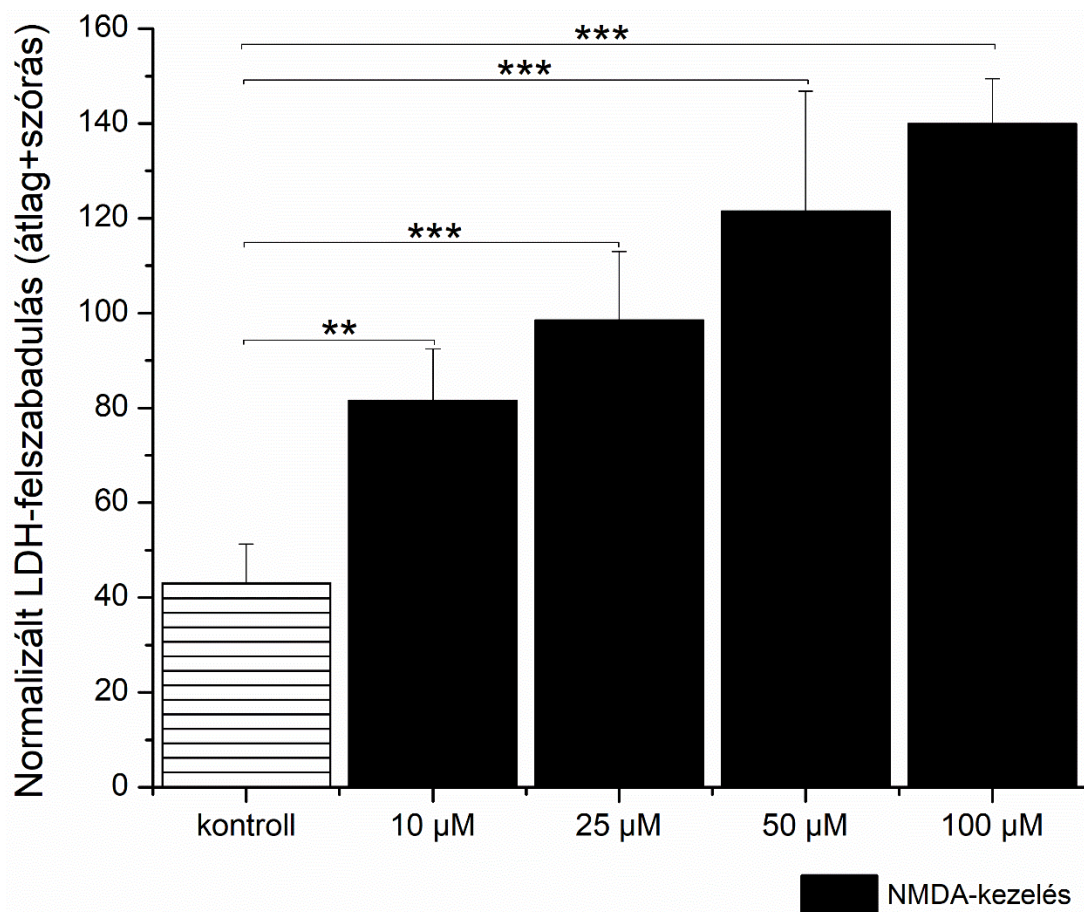
7. Eredmények

7.1. Neuromoduláló anyagok *in vitro* vizsgálata

7.1.1. NMDA-indukálta excitotoxicitás-modell

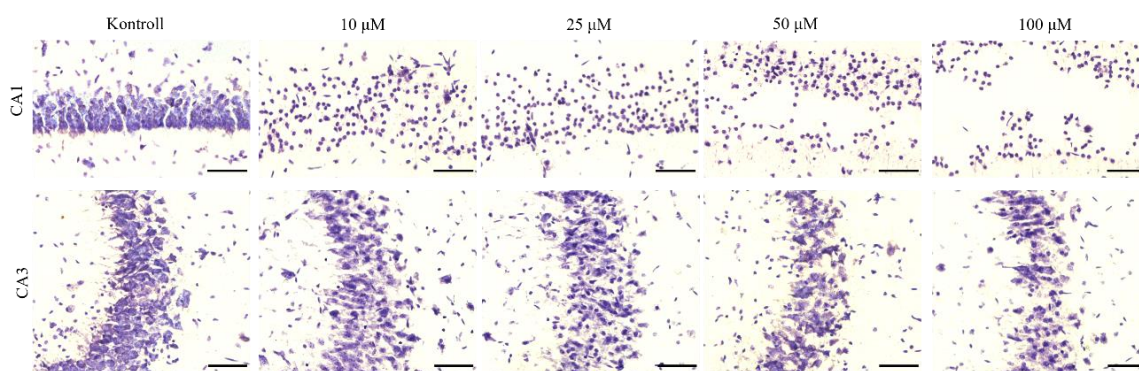
Az optimális excitotoxicitás-modell kiválasztásához az NMDA-t növekvő koncentrációkban (10-, 25-, 50- és 100 μM) alkalmaztuk KT inkubációs rendszerünkben. A kezelések hatására felszabaduló LDH koncentrációját és szövetmintáinkat kezeletlen, kontroll csoportokhoz viszonyítottuk.

Biokémiai vizsgálataink alapján elmondható, hogy a szakirodalomban leggyakrabban használt, 50 és 100 μM NMDA koncentrációk okozták a legnagyobb mértékű károsodást, azonban az alacsonyabb koncentrációk is szignifikáns sérülést indukáltak (2. ábra).



2. ábra: LDH-felszabadulás vizsgálata növekvő koncentrációban alkalmazott NMDA hatására, kezeletlen, kontroll akutagyszelet-preparátumokhoz viszonyítva, KT inkubációs rendszerben. Átlag + szórás. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n=24$.

A krezilibolya-festés bizonyítja, hogy az alkalmazott NMDA koncentrációk szignifikáns károsodást indukáltak a hippocampusz CA1-es régiójában, a sejtek piknotikus morfológiát mutatnak, a sejtsor denzitása is jelentősen megváltozott. A magasabb NMDA-koncentrációk olyan mértékű károsodást indukáltak a CA1-es régióban, hogy az ezekből készült szövettani metszetek további vizsgálatokra nem voltak alkalmasak. A CA3-as régió piramis sejtjei ezzel ellentétben ép morfológiát mutatnak, habár a sejtsor denzitása megváltozott. Nagyobb mértékű károsodás csak az 50- és 100 μ M-os NMDA koncentrációknál figyelhető meg ebben a régióban. Mindezek alapján az excitotoxicitás korfüggő hatását és a neuromoduláló anyagok hatástanát érintő vizsgálatokat csak a hippocampusz CA1-es régiójában folytattuk (**3. ábra**).



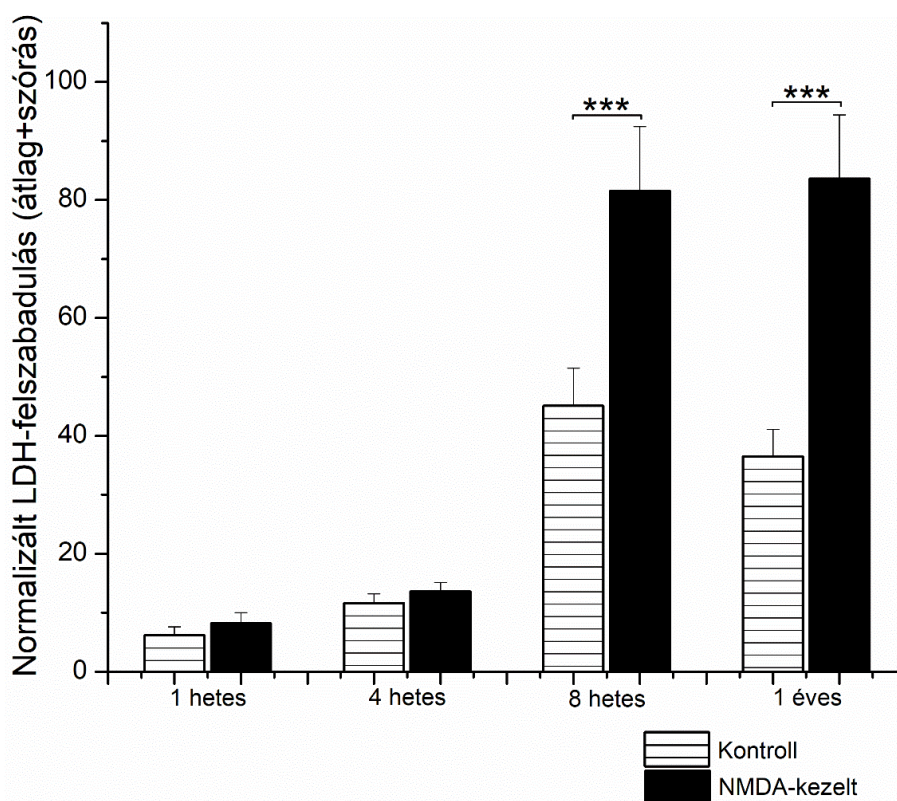
3. ábra: Krezilibolya-festés hippocampusz CA1-es és CA3-as régiójának piramis sejtsorában, emelkedő koncentrációban alkalmazott NMDA-kezelést követően. Skála: 50 μ m.

Mindezek alapján a további *in vitro* vizsgálatainkhoz a 10 μ M-os NMDA koncentrációt választottuk az excitotoxicitás indukálására.

7.1.2. NMDA-indukálta excitotoxicitás vizsgálata különböző korú állatok esetében

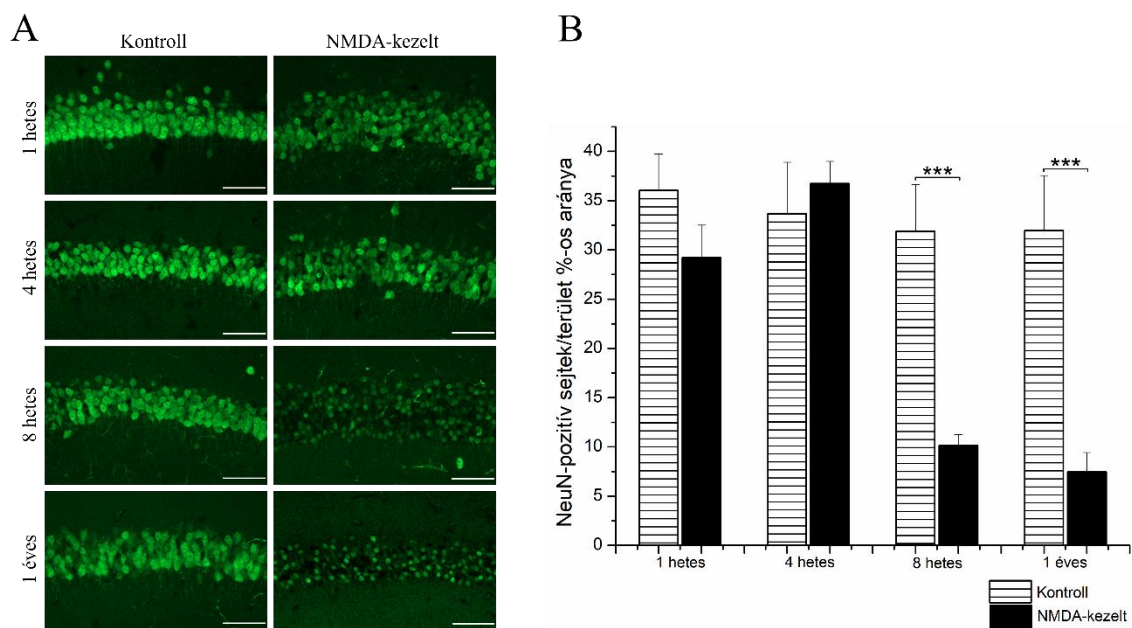
A korábban felállított 10 μ M NMDA-indukálta excitotoxicitás-modellünket különböző korú (1-, 4-, 8 hetes és 1 éves) állatok esetében is vizsgálat alá vetettük. Biokémiai módszerekkel a felülúszót, míg hisztológiai módszerekkel az akutagyszelet-preparátumokat vizsgáltuk.

Fiatal (1- és 4 hetes) állatcsoportok rezisztensebbnek bizonyultak az NMDA-indukálta excitotoxicitás károsító hatásával szemben. A 4 órás NMDA-kezelés nem okozott szignifikáns változást a felszabaduló LDH-szintjében a kontroll csoportokhoz képest. Fiatal felnőtt és idős állatok agyszövevei azonban sokkal nagyobb szenzitivitást mutattak az excitotoxicitásra; az NMDA-kezelt csoportokban szignifikáns LDH-szintemelkedést detektáltunk a felülúszóból a kontroll csoportokhoz viszonyítva (4.ábra).



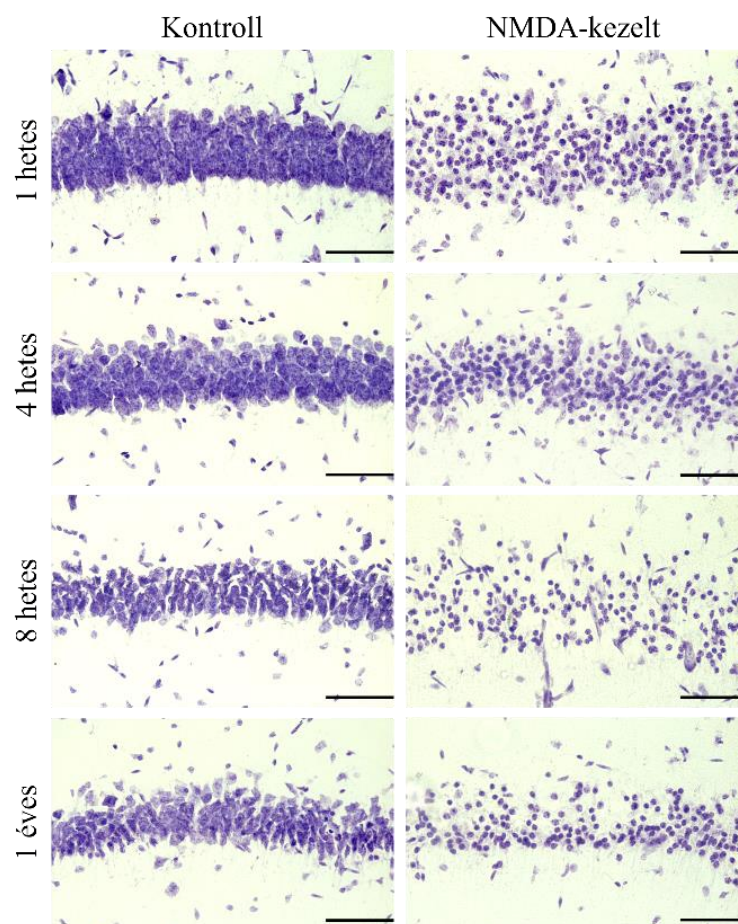
4. ábra: LDH-felszabadulás vizsgálata különböző korú állatok esetében, kontroll és NMDA-kezelt csoportoknál 4 órás inkubációt követően kis térfogatú inkubációs rendszerben. Átlag + szórás. *** $p < 0,001$, $n=24$.

Felnőtt állatok piramis sejt sorában jelentős károsodást detektáltunk: a sejtek atípusos morfológiát mutattak, illetve jelentős sejtelhalás volt megfigyelhető. A sejt sor denzitása minden korcsoport esetében megváltozott, valamint a fluoreszcencia intenzitása is lecsökkent az NMDA-kezelt csoportoknál a kontroll szövetekhez viszonyítva (**5. ábra A**). Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján elmondható, hogy bár a fiatal állatok CA1-es piramis sejt sora az NMDA-kezelés után sem maradt teljesen intakt, statisztikailag szignifikáns változás, vagy sejthalál nem történt (**5. ábra B**).



5. Ábra: A: Reprezentatív felvételek NeuN-immunjelölésről hippocampusz CA1-es régiójának piramis sejt sorából 4 órás inkubációt követően. Skála: 50 μ m. **B:** NeuN-immunpozitív sejtek %-os arányának ábrázolása egy 250 μ m² területen, ***p < 0,001, n=36.

Krezilibolya-festéssel minden vizsgált korcsoport hippocampuszában pontszerű megjelenésű sejteket detektáltuk. Minden korcsoport esetében megindult a piknózis folyamata: fiatal állatoknál a CA1 régió piramis sejt sora nagyobb denzitású, mint idősebb korú állatok agyából készült szövetek esetén. Feltételezhetően fiatal állatoknál is fellép excitotoxicitás, azonban ez vagy késleltetve, vagy pedig más mechanizmusokon keresztül valósul meg (**6. ábra**).

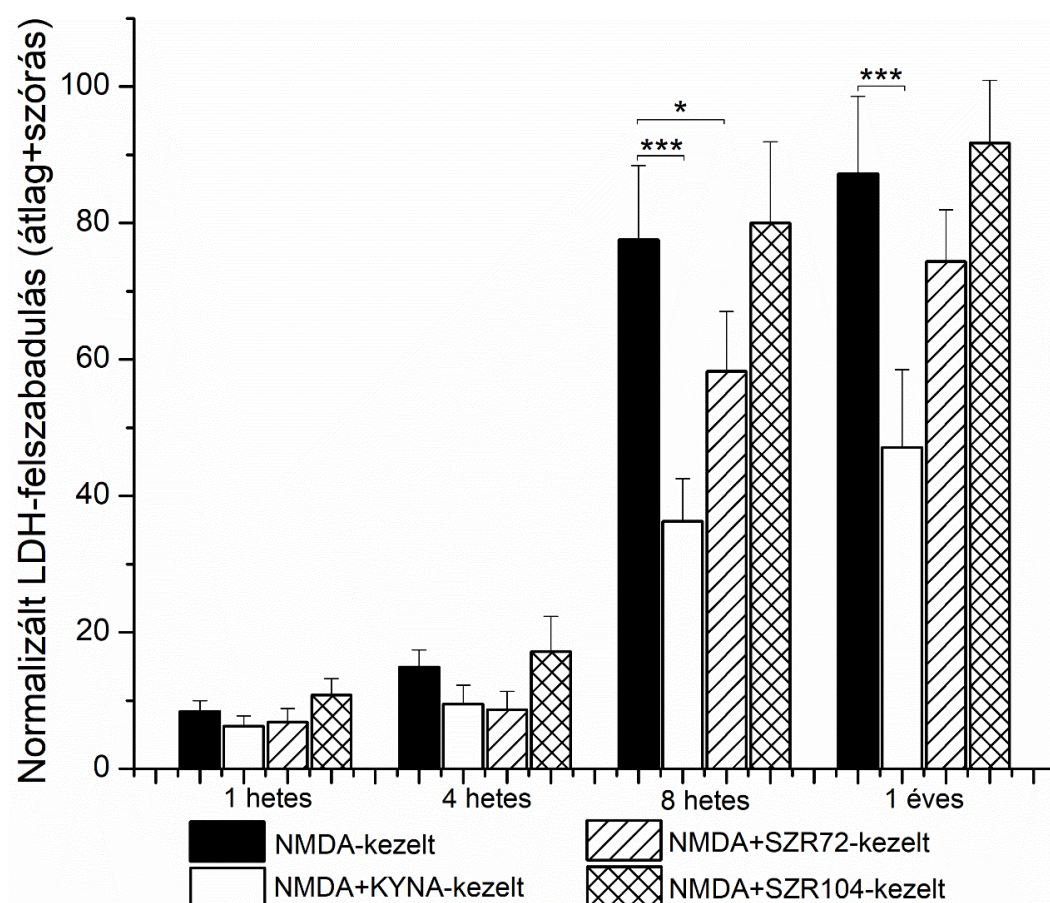


6. Ábra: Reprezentatív felvételek a krezilibolya-festésről hippocampusz CA1-es régiójának piramis sejtsorából 4 órás inkubációt követően. Skála: 50 μ m.

7.1.3. KYNA és analógjai neuromoduláló hatásának vizsgálata különböző korú állatok esetében

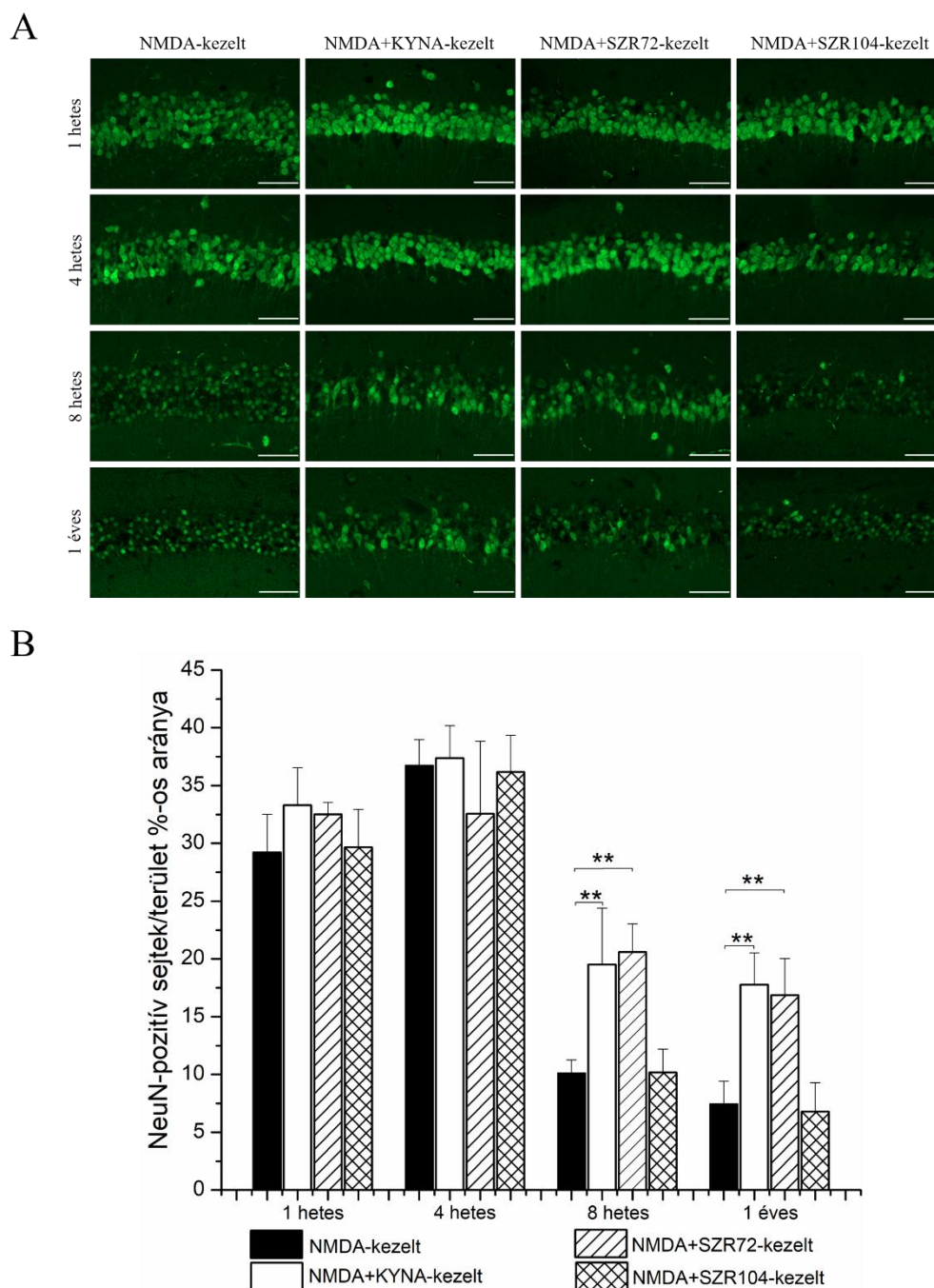
Az excitotoxicitással szemben különböző neuromoduláló anyagok (KYNA, SZR72 és SZR104) hatását is megvizsgáltuk 40 nM-os koncentrációban, KT-inkubációs rendszerünkben. Vizsgálataink a korábbiakhoz hasonlóan biokémiai és hisztológiai módszereket foglaltak magukba.

A biokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy az NMDA-indukálta excitotoxicitás károsító hatását a KYNA- és az SZR72-kezelés lecsökkentette minden korcsoport esetében. Statisztikailag szignifikáns változás csak az idősebb állatcsoportoknál volt megfigyelhető. Az SZR104-kezelés azonban nem okozott szignifikáns változást a felszabaduló LDH-szint tekintetében egyik korcsoport esetén sem, ami feltehetően az alkalmazott alacsony dózisa miatt következhetett be (7. ábra).



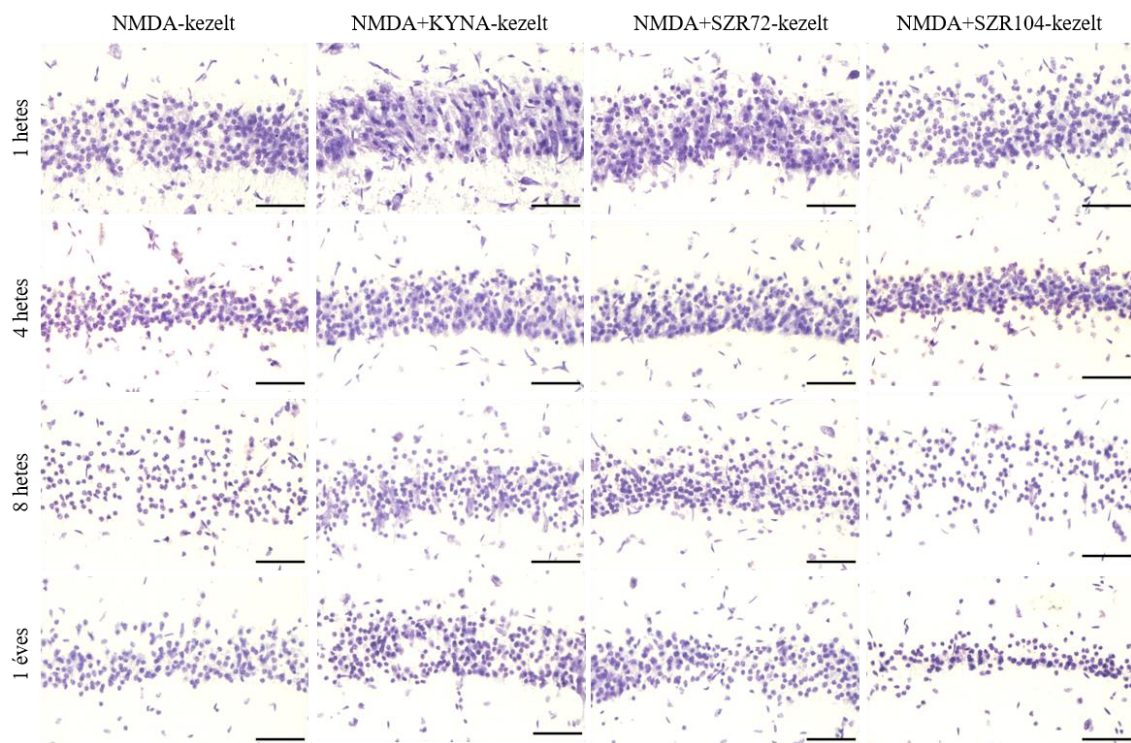
7. ábra: LDH-felszabadulás biokémiai vizsgálata NMDA-, KYNA-, SZR72- és SZR104-kezelt csoportok esetében 4 órás inkubáció után. Átlag + szórás. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, $n=48$.

Hisztológiai vizsgálatokban minden vizsgált korcsoport esetében hatásosnak bizonyult a KYNA- és az SZR72-kezelés NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben (8. ábra A). Habár a NeuN-pozitív sejtek száma lecsökkent a kezelt csoportoknál idősebb állatok esetében, a megmaradt sejtek többségében ép megjelenést mutattak. Az SZR104-kezelés azonban egyáltalán nem befolyásolta a NeuN-pozitív sejtek számát a piramisisejtek rétegében az NMDA-kezelt csoportokhoz viszonyítva (8. ábra B).



8. Ábra: **A:** Reprezentatív felvételek a NeuN-immunjelölésről különböző korú állatok hippocampusának CA1-es piramisisejtrétegéből 4 órás NMDA-, KYNA-, SZR72- és SZR104-kezelést követően. Skála: 50 μ m. **B:** NeuN pozitivitás/terület %-os aránya. ** $p < 0,01$, $n=60$.

Krezilibolya-festéssel az immunhisztokémiai festéseinkkel tapasztalt javulást nem detektáltuk felnőtt állatok esetében (**9. ábra**). A sejtek piknotikus morfológiát mutatnak az alkalmazott neuroprotektív kezelések ellenére is. A sejtrétegek denzitása sokkal nagyobb volt a KYNA- és SZR72-kezelt csoportok esetében, mint az NMDA-val és az SZR104-el kezelt csoportok esetében. Feltételezhetően a kezelés késleltette ugyan a sejtpusztulás folyamatát, de azt nem volt képes teljesen megakadályozni. SZR104-kezelés esetében nem detektáltunk szignifikáns változást az NMDA-kezelt csoportokhoz képest sem a sejt morfológia, sem pedig a sejtsűrűség tekintetében.

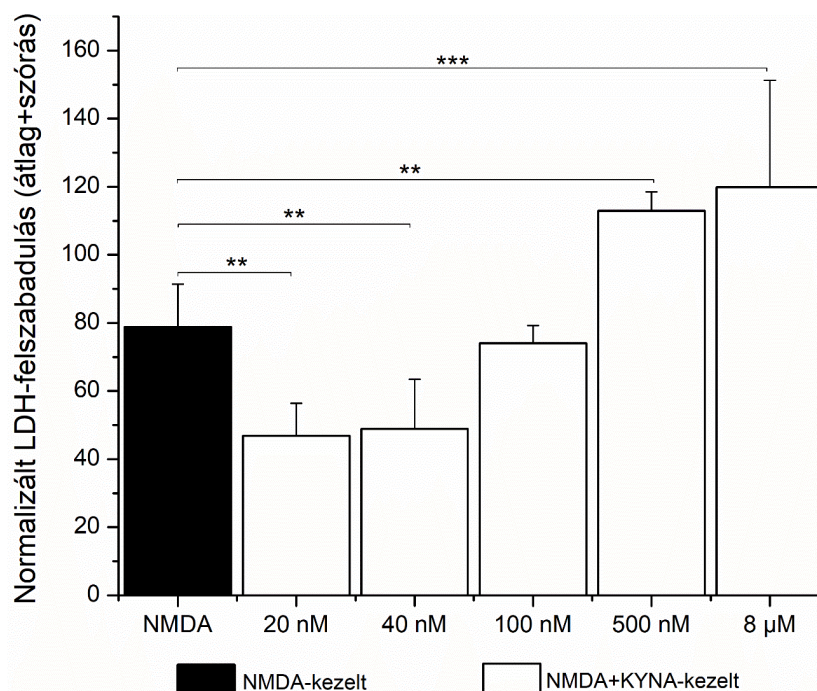


9. Ábra: Reprezentatív felvételek a krezilibolya-festésről különböző korú állatok hippokampuszának CA1-es piramissejtrétegéből 4 órás NMDA-, KYNA-, SZR72- és SZR104-kezelést követően. Skála: 50 μ m.

7.1.4. KYNA és analógjainak dózisfüggő hatásvizsgálata

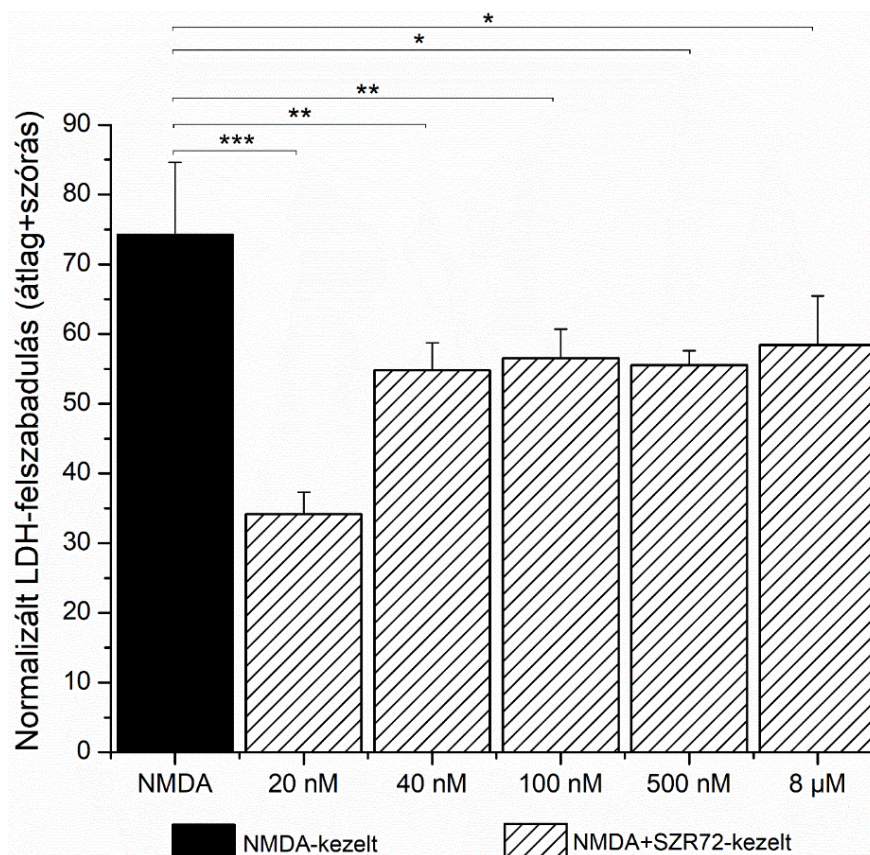
Korábbi vizsgálataink azt bizonyították, hogy a fiatal felnőtt (8 hetes) állatcsoport nagy érzékenységet mutat az excitotoxicitás károsító hatásával szemben, így a KYNA és analógjai dózisfüggő hatásának vizsgálatát kizárólag ezen a korcsoporton végeztük el. A KYNA-t és analógjait növekvő koncentrációban alkalmaztuk rendszerünkben, annak meghatározására, hogy milyen hatást fejtenek ki az NMDA károsító hatásával szemben. A szövetkárosodás mértékének meghatározására az extracelluláris LDH-szint kvantifikálásán alapuló biokémiai vizsgálatot alkalmaztuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy a KYNA alacsonyabb nanomólos koncentrációban fejti ki neuroprotektív hatását (**10. ábra**). 20 és 40 nM KYNA-kezelés szignifikánsan lecsökkentette az NMDA-indukálta excitotoxicitás károsító hatását, redukálta a felszabaduló LDH koncentrációját a felülszóban. 100 nM koncentrációban a KYNA hatástalannak bizonyult a toxikus ágenssel szemben. Tovább növelve a KYNA koncentrációját; nanomólos és mikromólos tartományban a KYNA tovább fokozta az NMDA károsító hatását. 500 nM-os és 8 μ M-os KYNA koncentrációk esetén szignifikáns LDH-szint emelkedést mértünk a felülszóból 4 órás inkubáció után.



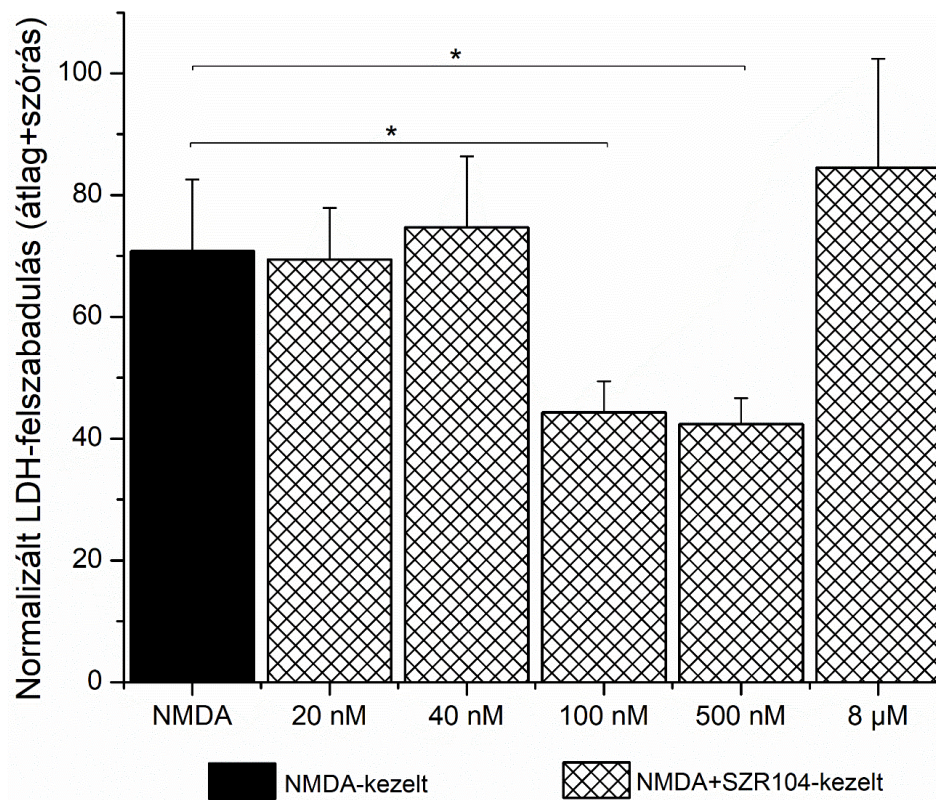
10. ábra: KYNA dózisfüggő hatásának vizsgálata NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben 4 órás inkubációt követően fiatal felnőtt állatok esetében. Átlag + szórás. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n=25$.

Biokémiai vizsgálataink alapján elmondható, hogy az SZR72 koncentrációtól függetlenül neuroprotektív hatással rendelkezik modellünkben, nanomólos és mikromólos koncentrációban is szignifikánsan csökkentette a felszabaduló LDH-szintjét NMDA-kezelt kontroll csoportokhoz viszonyítva (**11. ábra**). A legintenzívebb protektív hatást alacsony nanomólos koncentrációban fejtette ki KT-inkubációs rendszerünkben.



11. ábra: SZR72 dózisfüggő hatásának vizsgálata NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben 4 órás inkubációt követően fiatal felnőtt állatok esetében. Átlag + szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n=25$.

Eredményeink azt mutatják, hogy az SZR104-es KYNA-analóg alacsony nanomólos és mikromólos tartományban is hatástalan az NMDA-indukálta excitotoxicitás károsító hatásával szemben (**12. ábra**). Magasabb nanomólos (100 és 500 nM) koncentrációban azonban szignifikánsan lecsökkentette a felszabaduló LDH-szintet rendszerünkben.

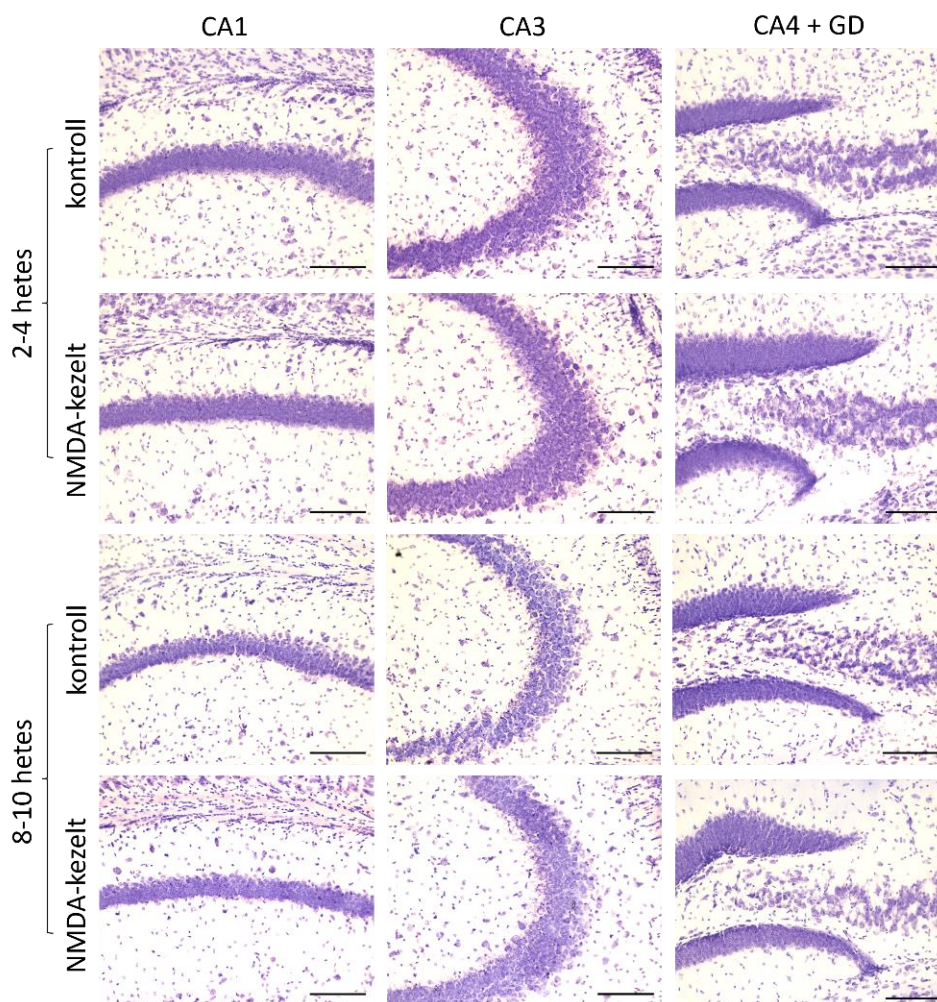


12. ábra: SZR104 dózisfüggő hatásának vizsgálata NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben 4 órás inkubációt követően fiatal felnőtt állatok esetében. Átlag + szórás. *p < 0,05, n=25.

7.2. NMDA-indukálta excitotoxicitás *in vivo* vizsgálata

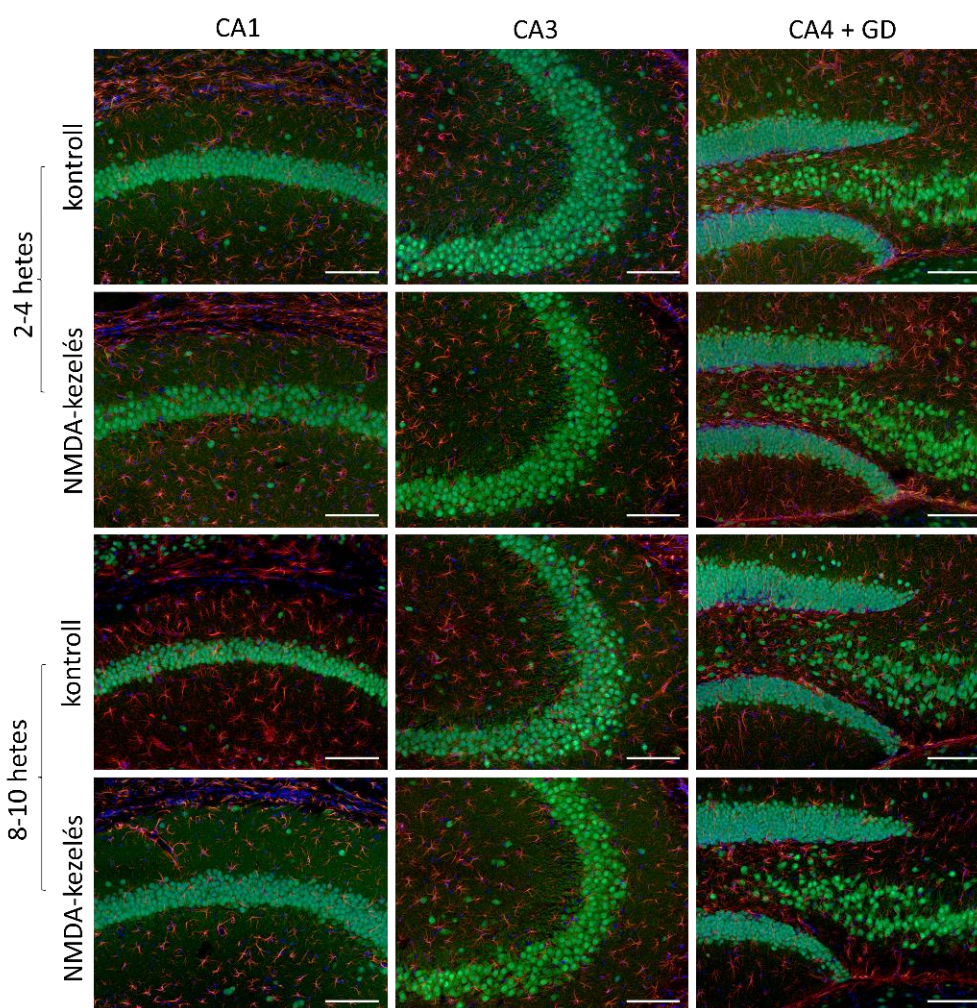
Az i.p. adott NMDA-kezelés potenciális károsító hatásának *in vivo* vizsgálatára hisztológiai módszereket (krezilibolya-festés, immunhisztokémia) alkalmaztunk. Összehasonlítottuk fiatal (2-4 hetes) és felnőtt (8-10 hetes) állatok hippocampusának CA1-es, CA3-as, CA4-es régiójának és a GD szövettani szerkezetét kontroll és NMDA-kezelt állatcsoportok esetében.

Krezilibolya-festéseink alapján elmondható, hogy ezen módszerrel az i.p. adott NMDA nem képes excitotoxicitás kiváltására egér hippocampusban sem fiatal, sem pedig felnőtt állatok esetében (**13. ábra**). A CA1-es, CA3-as, CA4-es piramissejtrétege és a GD granuláris sejtsorai is intaktak maradtak az NMDA-val kezelt állatok esetén, valamint a sejtrétegek denzitása és a sejtek alakja is ép maradt.



13. ábra: Krezilibolya-festés fiatal (2-4 hetes) és felnőtt (8-10 hetes) egerek hippocampusának különböző sejtrétegeiben kontroll és NMDA-kezelt csoportok esetében. Skála: 100 μ m, n=28.

Immunhisztokémiai vizsgálataink alátámasztják a krezilibolya-festés eredményeit. Egyik vizsgált korcsoport esetében sem detakáltuk az i.p. adott NMDA károsító hatását a neuronális állományban a hippocampusz egyik sejtrétegében sem (**14. ábra**). GFAP-immunjelölés alapján elmondható, hogy az NMDA-kezelés nem okoz detektálható asztrocita aktivációt ezen agyterületen sem fiatal, sem pedig felnőtt állatok esetében 24 órával a toxikus anyag beadását követően.



14. ábra: Fiatal (2-4 hetes) és felnőtt (8-10 hetes) egerek hippocampuszának sejtrétegeinek immunhisztokémia vizsgálata. Zöld: NeuN; Piros: GFAP; Kék: DAPI jelölés. Skála: 100 μ m, n=28.

Habár az i.p. adott NMDA hatására neuronális sérülést, illetve asztrocita aktivációt nem detektáltunk, intenzív magatartásbeli változásokat figyeltünk meg (**nem ábrázolt**). A fiatal, NMDA-kezelt fiatal (2-4 hetes) állatok esetében intenzív motoros aktivitás volt megfigyelhető közvetlenül az oltást követően. 1-1,5 órával az NMDA beadását követően e csoport esetében súlyos faroktő-sebzés volt megfigyelhető. Ezek a

tünetek a kísérlet 4. órájában elkezdtek feloldódni és a kísérlet végéig nem jelentkezett egyéb magatartásbeli eltérés. Kvantitatív magatartásvizsgálatokat nem állt módunkban elvégezni, ezek az eredmények kizárólag szisztematikus megfigyeléseink és állatjólléti pontrendszer által dokumentáltuk, azonban fontos információt szolgáltathatnak az i.p. adott NMDA hatását illetően.

8. Diskusszió

A Trp anyagcseréjének egyik fő végterméke a KYNA, amelynek egyensúlyzavara számos neurodegeneratív (AD, PD, HD) és pszichiátriai betegség (depresszió, skizofrénia) patomechanizmusában meghatározó szerepet játszik. Ennek alapján feltételezhető, hogy a KYNA-szintjének modulálása ígéretes terápiás célpontot jelenthet az említett betegségek kezelésében (Vécsei et al., 2013). A farmakológiai kihívások áthidalására a BBB-on átjutó, kémiaiailag módosított KYNA-analógok alkalmazása lehet az egyik megoldás (Fülöp et al., 2009). Értekezésem központi témáját a KYNA, valamint annak kémiaiailag módosított származékainak neuromoduláló, esetlegesen neuroprotektív hatásának vizsgálata képezte NMDA-indukálta excitotoxicitás-modellben, *in vitro* és *in vivo* körülmények között, különböző életkorú C57Bl/6 egerek agyszövetében.

Bevezető kísérleteink eredményei azt igazolják, hogy KT inkubációs rendszerünkben az NMDA már 10 μM koncentrációban elegendő az excitotoxicitás kiváltásához 8-10 hetes egerek agyából származó akutagyszelet-preparátumokon. A szakirodalomban *in vitro* környezetben jellemzően 50–100 μM -os NMDA-t alkalmaznak az excitotoxikus károsodás modellezésére (Liu et al., 2007; Zhou and Baudry, 2006). Rendszerünkben azonban a 25-100 μM koncentrációk olyan mértékű szövetkárosodást eredményeztek, amelyek nem tették lehetővé a későbbi hisztológiai elemzéseket. Ennek figyelembevételével munkacsoportunk a 10 μM NMDA koncentráció alkalmazása mellett döntött a további vizsgálatok során. Ez a dózis megfelelő mértékű károsodást idézett elő a hippocampusz CA1-es régiójában, ugyanakkor a szöveti integritás megőrződött, biztosítva a részletes morfológiai értékelést. Kísérleteink során a CA3-as régió piramissejtrétege nagyobb ellenállóképességet mutatott az NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben. Hasonló megfigyelésekről számoltak be Butler és munkatársai is, akik szerint az NMDA által közvetített neurodegeneráció elsősorban a CA1-es régió piramissejtjeit érinti. A jelenség hátterében a CA1-es régióban koncentrálódó szinaptikus bemenetek által fenntartott fokozott hálózati excitabilitás áll, amely elősegíti a degeneratív folyamatok kialakulását (Butler et al., 2010). Sun és munkatársai kimutatták, hogy a Ca^{2+} által kiváltott mitokondriális károsodás iránti érzékenység a CA1-es neuronokban jelentősen nagyobb, mint a CA3-as régióban (Sun et al., 2018). Bár az excitotoxikus események a CA3-as régiót is érintik, az itt működő immunfolyamatok bizonyos mértékű védelmet nyújtanak a CA1-es régióhoz viszonyítva. Vinet és munkatársai eredményei szerint excitotoxikus károsodás esetén a mikroglia

aktivitása főként a CA3-as régióban járulhat hozzá a neuroprotektív folyamatok fenntartásához (Vinet et al., 2012). Ennek alapján a továbbiakban az NMDA-indukálta excitotoxicitást *in vitro* környezetben kizárólag a hippocampusz CA1-es régiójában vizsgáltuk.

In vitro vizsgálataink alapján elmondható, hogy a felnőtt (8 hetes és 1 éves) állatokból származó akutagyszelet-preparátumok szignifikánsan nagyobb érzékenységet mutatnak az NMDA-indukálta excitotoxicitásra. Biokémiai elemzéseink során fokozott LDH-felszabadulást detektáltunk a felnőtt állatok mintáiban. NeuN immunjelölés és krezilibolya-festés alapján egyaránt megállapítható, hogy a hippocampusz CA1-es régiójának piramissejtrétegeiben 4 órás inkubációt követően számottevő szerkezeti károsodás és sejtdenzitás-csökkenés volt megfigyelhető. Ezzel szemben a fiatalabb (1- és 4 hetes) egerek hippocampuszában sem az LDH-felszabadulás, sem a NeuN immunjelölés nem mutatott szignifikáns eltérést kontroll és NMDA-kezelt szövetek között, bár a szövetek nem maradtak teljesen intaktak. A krezilibolya-festés fiatal állatok esetében azt mutatta, hogy megindul ugyan a sejthalál folyamata (a sejtek piknotikus megjelenésűek), azonban az késleltetve következik be. *In vivo* vizsgálataink során az i.p. adott NMDA egyik vizsgált korcsoportban sem okozott szignifikáns hisztológiai változást a hippocampusz területén. Itt nem részletezzük, de magatartásbeli eltérések megfigyelhetők voltak az NMDA-kezelt fiatal állatok esetében. A szakirodalom ellentmondásos az életkor függvényében bekövetkező excitotoxikus sejtkárosodást illetően: Zhou és Baudry olyan *in vitro* kísérleteket végeztek patkányok agyszövetein, amelyek kísérleti feltételei összevethetők voltak az általunk alkalmazott KT rendszerrel. Eredményeik alapján a fiatal (4 hetes) állatok hippocampuszában az NMDA-kezelést követően tipikusan piknotikus sejt morfológia alakult ki, míg az idősebb (3 hónapos) állatokban a piramissejtréteg sejt morfológiája megőrződött, azonban a sejtsűrűség jelentősen csökkent (Zhou and Baudry, 2006). Liu és munkatársai tanulmánya szerint a Glu-indukálta sejthalál idősebb patkányokban kifejezettebb. A 10- és 20 napos állatokban a sejthalál mértéke alacsonyabb, mint a 30- és 60 napos állatokban (Liu et al., 1996). Felnőtt egerekben végzett *in vivo* vizsgálatok azt mutatják, hogy három órával az NMDA egyszeri i.p. adását követően indukálódik a pip92 gén expressziója, amely fontos szerepet játszik az excitotoxicitás által kiváltott sejthalálban (Chung et al., 2000). Egy *in vivo* kutatásban i.p. alkalmazott NMDA-kezelés hatására magatartásbeli eltéréseket vizsgáltak különböző korú egerekben. A viselkedésbeli változások a fiatal állatoknál voltak a

leginkább megfigyelhetők. Kimutatták továbbá, hogy felnőtt egyedeknél a perifériásan alkalmazott NMDA csak kis mértékben képes átmenni a BBB-on (Kim et al., 2019). Ez a farmakológiai korlátozás felveti azt a kérdést, hogy az NMDA farmakodinámiája különbözik-e szisztémás, illetve lokális alkalmazás esetén: például intrakraniálisan, vagy a korábban részletezett *in vitro* kísérleteink során. Az i.p. alkalmazott NMDA valószínűleg alacsonyabb koncentrációt eredményez az agy szövetében, mint az excitotoxikus hatás kiváltásához szükséges küszöbérték, így a toxikus hatás nem érvényesülhet. Továbbá az éretlen hippocampális neuronok eltérő jelátviteli útvonalai és szinaptikus plaszticitása eltérő érzékenységet eredményezhetnek (Chen et al., 2020), ami magyarázhatja a kezelést követő biokémiai és hisztológiai változások hiányát fiatal állatcsoportok esetében.

A különböző életkorú állatok hippocampusának károsodásában megfigyelhető különbségek egyik lehetséges oka az NMDAR alegységek expressziójának változása: az NMDAR-ok esetében jellemző az ontogenetikus „alegységváltás” jelensége, amelynek során a fiatal korban domináns NR2B alegységeket fokozatosan felváltják az NR2A alegységek (González-González et al., 2023). Ez az alegységváltás jelentős hatással van a serkentő szinapszisok működésére, mivel az NR2A és NR2B receptorok eltérő jelátviteli mechanizmusokat aktiválhatnak a hippocampus különböző területein (Liu et al., 2004). Kortikális neuronális sejtenyészeteken végzett kísérletek megerősítették, hogy az NR1 és NR2B alegységek korán expresszálódnak, míg az NR2A alegységek csak a tenyésztés 10. napját követően kezdenek fokozatosan megjelenni, és ekkor kezdődik az NR2A- és NR2B alegységek ko-lokalizációja is (Li et al., 1998). Az egyes alegységeket tartalmazó NMDAR-ok a sejt más-más helyein lokalizálódhatnak; az NR2A alegységgel rendelkező receptorok jellemzően szinaptikus, míg az NR2B-t tartalmazó receptorok inkább extraszinaptikus helyeken helyezkednek el (Mohrmann et al., 2000). Az excitotoxikus károsodásért elsősorban az extraszinaptikus NMDAR-ok felelősek, azonban a megfelelő kísérleti körülmények között az NR2A alegységet tartalmazó szinaptikus NMDAR-ok is szerepet játszanak az excitotoxicitás kiváltásában (Yu et al., 2023).

A kalpain-indukálta spektrin degradációnak is fontos szerepe lehet az általunk tapasztalt eredmények tekintetében. Kutatások összefüggéseket találtak a Glu által aktivált serkentő aminosav-receptorok és a kalpain I aktivációja között, ami a neurodegeneráció kulcsfontosságú eseménye (Siman et al., 1989; Simonson et al., 1985). A kalpain I

intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedéssel aktiválódik és egy citoszkeletális protein, a spektrin degradációjához vezet (Tata and Yamamoto, 2008). Az NMDA-kezelés gyorsan aktiválja a kalpain I-et, elsősorban az újszülött patkányok esetében, mivel a kalpain szintje újszülött korban a legmagasabb, és ez a szint az életkor előrehaladtával folyamatosan csökken (Zhou and Baudry, 2006). A kalpain aktivációja különböző NMDAR alegységek, különösen az NR2 alegységek proteolíziséhez vezethet, ami a receptorok funkcionális tulajdonságainak megváltozását eredményezi, ezáltal hozzájárulva a neurotoxikus folyamatok kialakulásához (Dong et al., 2006; Zhou and Baudry, 2006).

Az életkorral összefüggő neurofilamentum-expressziós változások jelentősen fokozhatják az excitotoxikus károsodással szembeni szenzitivitást (Devarakonda et al., 2024; King et al., 2007). Az öregedés során a neurofilamentum-fehérjék szintjének csökkenése és foszforilációs állapotuk módosulása az axonális integritás romlásához és a neuronok strukturális sérülékenységének növekedéséhez vezethet (Deng et al., 2008; Zhou et al., 2023). Mindezek mellett a neurofilamentumok a Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásában is részt vesznek, így expressziójuk zavara közvetve fokozhatja a kalpain-aktivációt és az excitotoxicitás molekuláris mechanizmusainak erősödését (Crish and Calkins, 2011).

Bár az excitotoxicitás életkorfüggő aspektusairól szóló szakirodalom ellentmondásos, eredményeink hozzájárulhatnak a jelenség jobb megértéséhez. Vizsgálataink alapján az idősebb állatok fokozott érzékenységet mutattak az excitotoxikus károsodással szemben. Ugyanakkor a mögöttes molekuláris mechanizmusok pontos feltárása további kísérleteket igényel. Tekintettel arra, hogy az excitotoxicitás lefolyását számos tényező együttesen és kölcsönhatásaik révén befolyásolja, a folyamat átfogó megértése csak komplex, több szinten történő molekuláris vizsgálatok révén válhat lehetségessé. Munkánk így elsősorban kiindulópontként szolgál a KT rendszerekben zajló korfüggő excitotoxikus folyamatok további részletes analíziséhez.

KT inkubációs rendszerünkben végzett kísérleteink során a 40 nM koncentrációjú KYNA-kezelés szignifikáns neuroprotektív hatást mutatott az NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben felnőtt (8 hetes és 1 éves) állatok mintáiban. Biokémiai vizsgálatainkban jelentősen alacsonyabb LDH-szinteket detektáltunk a KYNA-val kezelt

csoportok felülúszóiban kizárólag NMDA-val kezelt csoportokhoz viszonyítva. Az inkubációt követően a szöveti integritás jelentősen megtartott: bár a sejtdenzitás nem érte el az intakt szövetekét, a sejtek alakja ép morfológiát tükröz. Ezzel szemben fiatal (1- és 4 hetes) állatok szövetmintáiban az NMDA-kezelés nem eredményezett szignifikáns szövetkárosodást rendszerünkben, és a KYNA alkalmazása nem befolyásolta sem a biokémiai (LDH-szint), sem a szövettani paramétereket. Korábbi kutatások bebizonyították, hogy a KYNA dózisfüggő kettős hatással rendelkezik (Prescott et al., 2006; Rózsa et al., 2008). Eredményeink fiatal felnőtt állatok szöveteiben megerősítették, hogy a KYNA sajátos, koncentrációfüggő kettős hatással bír: míg alacsony nanomoláris koncentrációkban (20 és 40 nM) jelentős neuroprotektív hatást tapasztaltunk, addig magasabb koncentrációk (100 nM) már nem, vagy pedig neurotoxikus hatást fejtenek ki (500 nM és 8 μ M).

A KYNA-t elsősorban az NMDAR-ok szelektív antagonistájaként tartják számon, azonban egyéb receptortípusokon is képes kifejteni gátló vagy facilitáló hatását az alkalmazott koncentráció függvényében (**Táblázat 1.**) (Schwarcz et al., 2012). A különböző receptorokhoz (AHR, AMPA, α 7nAChR) való kötődése elősegíti a downstream folyamatok modulálását, ami nagyban hozzájárul a KYNA citoprotektív hatásához (Gáspár et al., 2024). A KYNA neuroprotektív hatását sztrichnin-inszenzitív NMDAR-ok kompetitív gátlásával éri el, ami által gátlódik a Glu felszabadulása a preszintaptikus sejtekből (Kessler et al., 1989). A receptorantagonizmus mellett a KYNA ROS megkötése révén csökkenti az oxidatív stressz hatását is, ami tovább segíti a sejtek túlélését (Lugo-Huitrón et al., 2011). Chen és munkatársai bizonyították HIV-vel összefüggő neurokognitív zavarok esetén, hogy a KYNA képes fokozni az asztrociták Glu pufferelő funkcióját, így képes gátolni az excitotoxikus sejthalált (Chen et al., 2024).

Az SZR72-t a KYNA egyik legígéretesebb neuroprotektív analójaként tartják számon, pozitív hatását számos állatmodellben bizonyították, mint például iszkémia, vagy HD esetében (Gellért et al., 2011; Zádori et al., 2011b). Az analóg pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott, hatása azonban nagyban függ az alkalmazott kísérleti állatok fajtától és korától (Domoki et al., 2023; Ostapiuk and Urbanska, 2021). Az analóg antagonista hatását elsősorban NMDAR-okon fejti ki (Kassai et al., 2015), de opioid receptorok működését is képes modulálni (Samavati et al., 2017). Kutatások két lehetséges mechanizmust vetnek fel: az analóg vagy imitálja a KYNA egyes hatásait; vagy pedig a vegyület előanyagaként funkcionál, KYNA-vá átalakulva

fejtheti ki farmakokinetikai hatásait (Zádori et al., 2011a). Feltehetően az agy szövetben lokálisan az SZR72-ből szintetizálódó KYNA rendelkezik neuroprotektív hatással (Domoki et al., 2023).

Az SZR104 a KYNA egy BBB-permeábilis analógja (Molnár et al., 2021), melynek neuroprotektív hatását több állatkísérletes modellben bizonyították: protektívnek bizonyult pentiléntetrazol által kiváltott epileptiform görcsökkel szemben (Demeter et al., 2012) és iszkémiás modellben is (Fehér et al., 2019). Lajkó és munkatársai bizonyították, hogy az analóg gátolja a pro-inflammatorikus citokinek expresszióját, a mikroglia-aktivációt és a fagocitikus aktivitást (Lajkó et al., 2020). SM modellben az SZR104 képes volt az anti-inflammatorikus fenotípus felé tolni az aktivált mikrogliaikat, ezzel kifejtve protektív hatását (Pukoli and Vécsei, 2023).

A KYNA és annak analógjai jelentős szerepet játszanak a neuroprotekción, a neurotranszmitter-modulációban és a gyulladáscsökkentő hatásokban (Lukács et al., 2017). Terápiás potenciáljuk a pszichiátriai, neurodegeneratív és gyulladásos betegségek kezelésében szükségessé teszi hatásmechanizmusaik és hatékonyságuk további kutatását. Bár a kinurenineket már vizsgálták emberekben, fiziológiás szerepük és biomarkerként való alkalmazhatóságuk szempontjából (Al-Karagholi et al., 2021; Bakker et al., 2023; Park et al., 2020), az SZR72 és SZR104 analógokkal kapcsolatos közvetlen klinikai vizsgálatok eddig még nem történtek.

Excitotoxicitás modellben eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy a KYNA neuroprotektív hatással rendelkezik, a gyenge BBB-penetráció kiküszöbölésére pedig alkalmasak lehetnek kémiaiilag módosított analógjai. Ezek a KYNA-származékok alkalmasak lehetnek a jövőben különböző neurodegeneratív megbetegedések kezelésére. Vizsgálataink hozzájárulnak az excitotoxicitás korfüggő folyamatának megismeréséhez, amely jelenleg a neurobiológia egyik kevésbé ismert, ellentmondásos területét képezi.

9. Következtetések

Kísérleteink során a KYNA és analógjai (SZR72 és SZR104) neuromoduláló hatásainak feltérképezését tűztük ki célul, NMDA-indukálta excitotoxicitás modellben kis térfogatú inkubációs rendszerben, különböző korú egerek agyszövetében.

Eredményeink alapján a célkitűzések mentén megfogalmazott kérdéseinkre a következő válaszokat adhatjuk, és az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Kísérleteink bizonyították, hogy KT inkubációs rendszerünkben az NMDA már 10 μ M-os koncentrációban is elindítja az excitotoxicitás folyamatát, azonban a szövetek érzékenysége nagyban függ a kísérleti állatok korától. Vizsgálataink alapján, a felnőtt (8 hetes és 1 éves) állatcsoportok agyszövetei sokkal sérülékenyebbek, mint a fiatal (1- és 4 hetes) állatoké.

2. Elsőként vizsgáltuk a KYNA és analógjai (SZR72 és SZR104) neuromoduláló hatását különböző korú állatcsoportok esetében. NMDA-indukálta excitotoxicitás modellben a 40 nM-os KYNA és az SZR72 kezelés neuroprotektívnek bizonyult felnőtt (8 hetes és 1 éves) állatok esetében. Ezzel szemben fiatal (1- és 4 hetes) állatcsoportoknál nem voltak képesek befolyásolni a szöveti integritást. Az SZR104-es kezelés 40 nM-os koncentrációban hatástalannak bizonyult minden korcsoport esetében.

3. A KYNA kémiaiilag módosított analógjainak dózisfüggő hatásait kutatócsoportunk elsőként vizsgálta. Irodalmi adatok alapján a KYNA hatása dózisfüggő: egyes koncentrációkban neuroprotektív, míg más koncentrációkban neurotoxikus hatást mutat. Az excitotoxicitás modellben biokémiai vizsgálataink alátámasztották ezt a más módszerekkel, mások által tett megfigyeléseket: alacsony nanomólos dózisban protektív, magasabb nanomólos és mikromólos tartományban neurotoxikus hatású. **Eredményeink azt mutatják, hogy az SZR72 az általunk vizsgált koncentrációkban dózistól függetlenül neuroprotektív hatást gyakorol a vizsgált agyszövetekre. Noha az SZR104 a vizsgált koncentrációk többségében nem volt hatékony, a magasabb nanomólos tartományban szignifikáns protektív hatása volt megfigyelhető.**

4. Eredményeink alapján elmondható, hogy az i.p. adott NMDA nem képes excitotoxicitást indukálni sem fiatal (2-4 hetes), sem pedig fiatal felnőtt (8-10 hetes) állatok hippocampusában. Sem neuronális sejthalál, sem pedig asztrocita aktiváció

nem történt a beadást követően. Ezen vizsgálataink alátámasztják a korábbi, szakirodalomban fellelhető eredményeket.

Összességében megállapítható, hogy az általunk végzett *in vivo* és *in vitro* kísérletek, valamint azok eredményei számottevően hozzájárulnak a meglévő szakirodalom bővítéséhez, és érdemben támogatják a jövőbeli *in vivo* preklinikai vizsgálatok hatékonyságának növelését.

10. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Toldi Józsefnek, hogy csatlakozhattam kutatócsoportjához. Köszönettel tartozom a rengeteg szakmai segítségért, valamint, hogy a kutatócsoportban töltött éveim során bármilyen kérdéssel bizalommal fordulhattam hozzá.

Köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Kis Zsoltot, aki szakmai iránymutatásával, értékes tanácsaival és türelmével segítette a publikációim, disszertációm elkészítését és szakmai fejlődésemet.

Köszönöm tanszékvezetőnknek, Dr. Varga Csabának, hogy Ph.D. munkámat az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken végezhettem, valamint köszönöm minden segítségét az elmúlt években.

Köszönöm Prof. Dr. Vécsei Lászlónak a hasznos szakmai meglátásokat és tanácsokat. Hálás vagyok Magyariné Dr. Berkó Anikónak a biokémiai mérések elvégzéséért, valamint Kisné Dr. Dobos Ildikónak, hogy lehetővé tette a szövettani metszetek elkészítését.

Köszönöm munkatársamnak és barátomnak, Jenei Gyulának a sokéves közös munkát, valamint azt, hogy nemcsak szakmailag, hanem barátilag is mindig mellettem állt. Szeretnék köszönetet mondani Tóth-Njers Sanelának a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért, valamint Dr. Takács Dórának és Dr. Rózsa Évának, akik szakfordítói tudásukkal hozzájárultak kézírataim és disszertációm minőségéhez.

Köszönet illeti Dr. Szatmári Istvánt és Dr. Lőrinczi Bálintot a KYNA-analógok szintetizálásáért. Köszönöm továbbá Dr. Gellért Leventének, Dr. Herédi Juditnak, Huszár Lászlóné Dr. Fehér Evelinnek és Dr. Farkas Tamásnak a munkám során nyújtott segítséget.

Hálás vagyok az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék jelenlegi és egykori munkatársainak, akik munkámat segítették. Külön köszönetet szeretnék mondani jelenlegi munkatársaimnak, a Kísérletes Neonatológia Labor kutatóinak, akik hasznos tanácsaikkal segítettek a disszertációm megírását.

Végül, de nem utolsósorban szívből köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek, testvéreimnek és barátaimnak, hogy tartották bennem a lelket egyetemem éveim során.

11. Irodalomjegyzék

- Acharyya, D., Cooper, J., Prosser, R.A., 2022. Ex vivo comparative investigation of suprachiasmatic nucleus excitotoxic resiliency. *F1000Research* 11, 1242. <https://doi.org/10.12688/f1000research.125332.2>
- Alarcan, H., Chaumond, R., Emond, P., Benz-De Bretagne, I., Lefèvre, A., Bakkouche, S.-E., Veyrat-Durebex, C., Vourc'h, P., Andres, C., Corcia, P., Blasco, H., 2021. Some CSF Kynurenine Pathway Intermediates Associated with Disease Evolution in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomolecules* 11, 691. <https://doi.org/10.3390/biom11050691>
- Albuquerque, E.X., Schwarcz, R., 2013. Kynurenic acid as an antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.014>
- Al-Karagholi, M.A.-M., Hansen, J.M., Abou-Kassem, D., Hansted, A.K., Ubhayasekera, K., Bergquist, J., Vécsei, L., Jansen-Olesen, I., Ashina, M., 2021. Phase 1 study to access safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of kynurenine in healthy volunteers. *Pharmacol. Res. Perspect.* 9, e00741. <https://doi.org/10.1002/prp2.741>
- Antenucci, N., D'Errico, G., Fazio, F., Nicoletti, F., Bruno, V., Battaglia, G., 2024. Changes in kynurenine metabolites in the gray and white matter of the dorsolateral prefrontal cortex of individuals affected by schizophrenia. *Schizophr. Heidelberg. Ger.* 10, 27. <https://doi.org/10.1038/s41537-024-00447-3>
- Arteaga-Henriquez, G., Burger, B., Weidinger, E., Grosse, L., Moll, N., Schuetze, G., Schwarz, M., Wijkhuijs, A., Op de Beeck, G., Berghmans, R., Versnel, M.A., Arolt, V., Müller, N., Drexhage, H.A., 2021. Activation and deactivation steps in the tryptophan breakdown pathway in major depressive disorder: A link to the monocyte inflammatory state of patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 107, 110226. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110226>
- Atlas, A., Gisslén, M., Nordin, C., Lindström, L., Schwieler, L., 2007. Acute psychotic symptoms in HIV-1 infected patients are associated with increased levels of kynurenic acid in cerebrospinal fluid. *Brain. Behav. Immun.* 21, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.02.005>
- Bagasrawala, I., Zecevic, N., Radonjić, N.V., 2016. N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development. *Front. Neurosci.* 10, 435. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00435>
- Baker, D.A., McFarland, K., Lake, R.W., Shen, H., Tang, X.-C., Toda, S., Kalivas, P.W., 2003. Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat. Neurosci.* 6, 743–749. <https://doi.org/10.1038/nn1069>
- Bakker, L., Ramakers, I.H.G.B., J P M Eussen, S., Choe, K., van den Hove, D.L.A., Kenis, G., Rutten, B.P.F., van Oostenbrugge, R.J., Staals, J., Ulvik, A., Ueland, P.M., Verhey, F.R.J., Köhler, S., 2023. The role of the kynurenine pathway in cognitive functioning after stroke: A prospective clinical study. *J. Neurol. Sci.* 454, 120819. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2023.120819>
- Balla, Z., Kormányos, E.S., Kui, B., Bálint, E.R., Fűr, G., Orján, E.M., Iványi, B., Vécsei, L., Fülöp, F., Varga, G., Harazin, A., Tubak, V., Deli, M.A., Papp, C., Gácsér, A., Madácsy, T., Venglovecz, V., Maléth, J., Hegyi, P., Kiss, L., Rakonczay, Z., 2021. Kynurenic Acid

- and Its Analogue SZR-72 Ameliorate the Severity of Experimental Acute Necrotizing Pancreatitis. *Front. Immunol.* 12, 702764. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.702764>
- Balog, E., Jenei, G., Gellért, L., Ono, E., Vécsei, L., Toldi, J., Kis, Z., 2021. Species-specific neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the mouse cerebellum. *Neurochem. Int.* 142, 104920. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104920>
- Bannerman, P., Horiuchi, M., Feldman, D., Hahn, A., Itoh, A., See, J., Jia, Z.P., Itoh, T., Pleasure, D., 2007. GluR2-free alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors intensify demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 102, 1064–1070. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04612.x>
- Baran, H., Jellinger, K., Deicke, L., 1999. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 106, 165–181. <https://doi.org/10.1007/s007020050149>
- Beal, M.F., Matson, W.R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E.A., Ogawa, T., Bird, E.D., 1992. Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 108, 80–87. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(92\)90191-m](https://doi.org/10.1016/0022-510x(92)90191-m)
- Birch, P.J., Grossman, C.J., Hayes, A.G., 1988. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 154, 85–87. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90367-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90367-6)
- Blizzard, C.A., Southam, K.A., Dawkins, E., Lewis, K.E., King, A.E., Clark, J.A., Dickson, T.C., 2015. Identifying the primary site of pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis - vulnerability of lower motor neurons to proximal excitotoxicity. *Dis. Model. Mech.* 8, 215–224. <https://doi.org/10.1242/dmm.018606>
- Bosco, M.C., Rapisarda, A., Massazza, S., Melillo, G., Young, H., Varesio, L., 2000. The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 3283–3291. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.6.3283>
- Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2013. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 45, 413–418. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1280-4>
- Butler, T.R., Self, R.L., Smith, K.J., Sharrett-Field, L.J., Berry, J.N., Littleton, J.M., Pauly, J.R., Mulholland, P.J., Prendergast, M.A., 2010. Selective vulnerability of hippocampal cornu ammonis 1 pyramidal cells to excitotoxic insult is associated with the expression of polyamine-sensitive N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors. *Neuroscience* 165, 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.018>
- Caviedes, A., Maturana, B., Corvalán, K., Engler, A., Gordillo, F., Varas-Godoy, M., Smalla, K.-H., Batiz, L.F., Lafourcade, C., Kaehne, T., Wyneken, U., 2021. eNOS-dependent S-nitrosylation of the NF-κB subunit p65 has neuroprotective effects. *Cell Death Dis.* 12, 4. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03338-4>
- Chen, F., Danladi, J., Wegener, G., Madsen, T.M., Nyengaard, J.R., 2020. Sustained Ultrastructural Changes in Rat Hippocampal Formation After Repeated Electroconvulsive Seizures. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 23, 446–458. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa021>

- Chen, J., Zou, J., Huang, P., Gao, X., Lun, J., Li, Y., Gong, Z., Cao, H., 2024. KYNA Ameliorates Glutamate Toxicity of HAND by Enhancing Glutamate Uptake in A2 Astrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 4286. <https://doi.org/10.3390/ijms25084286>
- Chen, P., Geng, X., 2023. Research progress on the kynurenine pathway in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 38, 2225800. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2225800>
- Choi, D.W., 2020. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Front. Neurosci.* 14, 579953. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.579953>
- Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 7, 369–379. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-02-00369.1987>
- Chung, K.C., Shin, S.W., Yoo, M., Lee, M.Y., Lee, H.W., Choe, B.K., Ahn, Y.S., 2000. A systemic administration of NMDA induces immediate early gene *pip92* in the hippocampus. *J. Neurochem.* 75, 9–17. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750009.x>
- Clark, S.M., Pocivavsek, A., Nicholson, J.D., Notarangelo, F.M., Langenberg, P., McMahon, R.P., Kleinman, J.E., Hyde, T.M., Stiller, J., Postolache, T.T., Schwarcz, R., Tonelli, L.H., 2016. Reduced kynurenine pathway metabolism and cytokine expression in the prefrontal cortex of depressed individuals. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 41, 386–394. <https://doi.org/10.1503/jpn.150226>
- Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E., Westbrook, G.L., 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258, 1498–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1359647>
- Cogo, A., Mangin, G., Maïer, B., Callebert, J., Mazighi, M., Chabriat, H., Launay, J.-M., Huberfeld, G., Kubis, N., 2021. Increased serum QUIN/KYNA is a reliable biomarker of post-stroke cognitive decline. *Mol. Neurodegener.* 16, 7. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00421-4>
- Correia, A.S., Vale, N., 2022. Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 8493. <https://doi.org/10.3390/ijms23158493>
- Crish, S.D., Calkins, D.J., 2011. Neurodegeneration in glaucoma: progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience* 176, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.036>
- Demeter, I., Nagy, K., Gellért, L., Vécsei, L., Fülöp, F., Toldi, J., 2012. A novel kynurenic acid analog (SZR104) inhibits pentylenetetrazole-induced epileptiform seizures. An electrophysiological study : special issue related to kynurenine. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 119, 151–154. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0755-x>
- Deng, Y., Li, B., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Brandt, R., Gong, C.-X., 2008. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 138–145. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8309com>
- Devarakonda, S.S., Basha, S., Pithakumar, A., L b, T., Mukunda, D.C., Rodrigues, J., K, A., Biswas, S., Pai, A.R., Belurkar, S., Mahato, K.K., 2024. Molecular mechanisms of

- neurofilament alterations and its application in assessing neurodegenerative disorders. *Ageing Res. Rev.* 102, 102566. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102566>
- DiNatale, B.C., Murray, I.A., Schroeder, J.C., Flaveny, C.A., Lahoti, T.S., Laurenzana, E.M., Omiecinski, C.J., Perdew, G.H., 2010. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 115, 89–97. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq024>
- Domoki, F., Tóth-Szűki, V., Kovács, V., Remzsó, G., Körmöczy, T., Vécsei, L., Berkecz, R., 2023. Differential Effects of Hypothermia and SZR72 on Cerebral Kynurenine and Kynurenic Acid in a Piglet Model of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 14522. <https://doi.org/10.3390/ijms241914522>
- Dong, Y.N., Wu, H.-Y., Hsu, F.-C., Coulter, D.A., Lynch, D.R., 2006. Developmental and cell-selective variations in N-methyl-D-aspartate receptor degradation by calpain. *J. Neurochem.* 99, 206–217. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04096.x>
- Erhardt, S., Lim, C.K., Linderholm, K.R., Janelidze, S., Lindqvist, D., Samuelsson, M., Lundberg, K., Postolache, T.T., Träskman-Bendz, L., Guillemin, G.J., Brundin, L., 2013. Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 743–752. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.248>
- Erhardt, S., Olsson, S.K., Engberg, G., 2009. Pharmacological manipulation of kynurenic acid: potential in the treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs* 23, 91–101. <https://doi.org/10.2165/00023210-200923020-00001>
- Fang, M., Li, J., Tiu, S.C., Zhang, L., Wang, M., Yew, D.T., 2005. N-methyl-D-aspartate receptor and apoptosis in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. *J. Neurosci. Res.* 81, 269–274. <https://doi.org/10.1002/jnr.20558>
- Fathi, M., Vakili, K., Yaghoobpoor, S., Tavasol, A., Jazi, K., Mohamadkhani, A., Klegeris, A., McElhinney, A., Mafi, Z., Hajiesmaeili, M., Sayehmiri, F., 2022. Dynamic changes in kynurenine pathway metabolites in multiple sclerosis: A systematic review. *Front. Immunol.* 13, 1013784. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1013784>
- Fazio, F., Lionetto, L., Curto, M., Iacovelli, L., Cavallari, M., Zappulla, C., Ulivieri, M., Napoletano, F., Capi, M., Corigliano, V., Scaccianoce, S., Caruso, A., Miele, J., De Fusco, A., Di Menna, L., Comparelli, A., De Carolis, A., Gradini, R., Nisticò, R., De Blasi, A., Girardi, P., Bruno, V., Battaglia, G., Nicoletti, F., Simmaco, M., 2015. Xanthurenic Acid Activates mGlu2/3 Metabotropic Glutamate Receptors and is a Potential Trait Marker for Schizophrenia. *Sci. Rep.* 5, 17799. <https://doi.org/10.1038/srep17799>
- Fazio, F., Lionetto, L., Curto, M., Iacovelli, L., Copeland, C.S., Neale, S.A., Bruno, V., Battaglia, G., Salt, T.E., Nicoletti, F., 2017. Cinnabaric acid and xanthurenic acid: Two kynurenine metabolites that interact with metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology, The Kynurenine Pathway in Health and Disease* 112, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.020>
- Fehér, E., Szatmári, I., Dudás, T., Zalatnai, A., Farkas, T., Lőrinczi, B., Fülöp, F., Vécsei, L., Toldi, J., 2019. Structural Evaluation and Electrophysiological Effects of Some Kynurenic Acid Analogs. *Molecules* 24, 3502. <https://doi.org/10.3390/molecules24193502>

- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S.I., Takada, Y., Smith, Q.R., 1991. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J. Neurochem.* 56, 2007–2017. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x>
- Fülöp, F., Szatmári, I., Vámos, E., Zádori, D., Toldi, J., Vécsei, L., 2009. Syntheses, transformations and pharmaceutical applications of kynurenic acid derivatives. *Curr. Med. Chem.* 16, 4828–4842. <https://doi.org/10.2174/092986709789909602>
- Gambrill, A.C., Barria, A., 2011. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5855–5860. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012676108>
- Gáspár, R., Nógrádi-Halmi, D., Demján, V., Diószegi, P., Igaz, N., Vincze, A., Pipicz, M., Kiricsi, M., Vécsei, L., Csont, T., 2024. Kynurenic acid protects against ischemia/reperfusion injury by modulating apoptosis in cardiomyocytes. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 29, 1483–1498. <https://doi.org/10.1007/s10495-024-02004-w>
- Gellért, L., Fuzik, J., Göblös, A., Sárközi, K., Marosi, M., Kis, Z., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Toldi, J., 2011. Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 667, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.069>
- Gellért, L., Varga, D., Ruszka, M., Toldi, J., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Kis, Z., 2012. Behavioural studies with a newly developed neuroprotective KYNA-amide. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 119, 165–172. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0692-8>
- González-González, I.M., Gray, J.A., Ferreira, J., Conde-Dusman, M.J., Bouchet, D., Perez-Otaño, I., Groc, L., 2023. GluN3A subunit tunes NMDA receptor synaptic trafficking and content during postnatal brain development. *Cell Rep.* 42, 112477. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112477>
- González-Sánchez, M., Jiménez, J., Narváez, A., Antequera, D., Llamas-Velasco, S., Martín, A.H.-S., Arjona, J.A.M., Munain, A.L. de, Bisa, A.L., Marco, M.-P., Rodríguez-Núñez, M., Pérez-Martínez, D.A., Villarejo-Galende, A., Bartolome, F., Domínguez, E., Carro, E., 2020. Kynurenic Acid Levels are Increased in the CSF of Alzheimer's Disease Patients. *Biomolecules* 10, 571. <https://doi.org/10.3390/biom10040571>
- Granzotto, A., Canzoniero, L.M.T., Sensi, S.L., 2020. A Neurotoxic Ménage-à-trois: Glutamate, Calcium, and Zinc in the Excitotoxic Cascade. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 600089. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.600089>
- Guidetti, P., Hoffman, G.E., Melendez-Ferro, M., Albuquerque, E.X., Schwarcz, R., 2007. Astrocytic localization of kynurenine aminotransferase II in the rat brain visualized by immunocytochemistry. *Glia* 55, 78–92. <https://doi.org/10.1002/glia.20432>
- Guillemin, G.J., 2012. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 279, 1356–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>
- Guillemin, G.J., Smythe, G., Takikawa, O., Brew, B.J., 2005. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 49, 15–23. <https://doi.org/10.1002/glia.20090>

- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., Traynelis, S.F., 2018. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 150, 1081–1105. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>
- Harris, C.A., Miranda, A.F., Tanguay, J.J., Boegman, R.J., Beninger, R.J., Jhamandas, K., 1998. Modulation of striatal quinolinic acid neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *Br. J. Pharmacol.* 124, 391–399. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701834>
- Hartai, Z., Juhász, A., Rimanóczy, A., Janáky, T., Donkó, T., Dux, L., Penke, B., Tóth, G.K., Janka, Z., Kálmán, J., 2007. Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 50, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.08.012>
- Hartai, Z., Klivenyi, P., Janaky, T., Penke, B., Dux, L., Vecsei, L., 2005. Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 112, 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00442.x>
- Herédi, J., Berkó, A.M., Jankovics, F., Iwamori, T., Iwamori, N., Ono, E., Horváth, S., Kis, Z., Toldi, J., Vecsei, L., Gellért, L., 2017. Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain. *Brain Struct. Funct.* 222, 1663–1672. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1299-5>
- Herédi, J., Cseh, E.K., Berkó, A.M., Veres, G., Zádori, D., Toldi, J., Kis, Z., Vecsei, L., Ono, E., Gellért, L., 2019. Investigating KYNA production and kynurenergic manipulation on acute mouse brain slice preparations. *Brain Res. Bull.* 146, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.014>
- Herman, M.A., Jahr, C.E., 2007. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9736–9741. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3009-07.2007>
- Heyes, M.P., Saito, K., Crowley, J.S., Davis, L.E., Demitrack, M.A., Der, M., Dilling, L.A., Elia, J., Kruesi, M.J., Lackner, A., 1992. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain J. Neurol.* 115 (Pt 5), 1249–1273. <https://doi.org/10.1093/brain/115.5.1249>
- Hornok, V., Amin, K.W.K., Kovács, A.N., Juhász, Á., Katona, G., Balogh, G.T., Csapó, E., 2022. Increased blood-brain barrier permeability of neuroprotective drug by colloidal serum albumin carriers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 220, 112935. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112935>
- Ilzecka, J., Kocki, T., Stelmasiak, Z., Turski, W.A., 2003. Endogenous protectant kynurenic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 107, 412–418. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2003.00076.x>
- Jansson, L.C., Louhivuori, L., Wigren, H.-K., Nordström, T., Louhivuori, V., Castrén, M.L., Åkerman, K.E., 2013. Effect of glutamate receptor antagonists on migrating neural progenitor cells. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1369–1382. <https://doi.org/10.1111/ejn.12152>
- Jhamandas, K.H., Boegman, R.J., Beninger, R.J., Miranda, A.F., Lipic, K.A., 2000. Excitotoxicity of quinolinic acid: modulation by endogenous antagonists. *Neurotox. Res.* 2, 139–155. <https://doi.org/10.1007/BF03033790>

- Joisten, N., Ruas, J.L., Braidy, N., Guillemin, G.J., Zimmer, P., 2021. The kynurenine pathway in chronic diseases: a compensatory mechanism or a driving force? *Trends Mol. Med.* 27, 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.07.006>
- Jones, S.P., Guillemin, G.J., Brew, B.J., 2013. The kynurenine pathway in stem cell biology. *Int. J. Tryptophan Res. IJTR* 6, 57–66. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S12626>
- Juhász, L., Rutai, A., Fejes, R., Tallósy, S.P., Poles, M.Z., Szabó, A., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Boros, M., Kaszaki, J., 2020. Divergent Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid and the Synthetic Analog SZR-72 on Microcirculatory and Mitochondrial Dysfunction in Experimental Sepsis. *Front. Med.* 7, 566582. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.566582>
- Kamal, H., Tan, G.C., Ibrahim, S.F., Shaikh, M.F., Mohamed, I.N., Mohamed, R.M.P., Hamid, A.A., Ugusman, A., Kumar, J., 2020. Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay Between Oxidative Stress, Neuroimmune Response and Excitotoxicity. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00282>
- Kassai, F., Kedves, R., Gyertyán, I., Tuka, B., Fülöp, F., Toldi, J., Lendvai, B., Vécsei, L., 2015. Effect of a kynurenic acid analog on home-cage activity and body temperature in rats. *Pharmacol. Rep. PR* 67, 1188–1192. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.015>
- Kepplinger, B., Baran, H., Kainz, A., Ferraz-Leite, H., Newcombe, J., Kalina, P., 2005. Age-related increase of kynurenic acid in human cerebrospinal fluid - IgG and beta2-microglobulin changes. *Neurosignals* 14, 126–135. <https://doi.org/10.1159/000086295>
- Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., Baudry, M., 1989. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J. Neurochem.* 52, 1319–1328. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb01881.x>
- Kim, S., Kim, D.G., Gonzales, E.L., Mabunga, D.F.N., Shin, D., Jeon, S.J., Shin, C.Y., Ahn, T., Kwon, K.J., 2019. Effects of Intraperitoneal N-methyl-D-aspartate (NMDA) Administration on Nociceptive/Repetitive Behaviors in Juvenile Mice. *Biomol. Ther.* 27, 168–177. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.230>
- King, A.E., Dickson, T.C., Blizzard, C.A., Foster, S.S., Chung, R.S., West, A.K., Chuah, M.I., Vickers, J.C., 2007. Excitotoxicity mediated by non-NMDA receptors causes distal axonopathy in long-term cultured spinal motor neurons. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2151–2159. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05845.x>
- Knyihar-Csillik, E., Mihaly, A., Krisztin-Peva, B., Robotka, H., Szatmari, I., Fulop, F., Toldi, J., Csillik, B., Vecsei, L., 2008. The kynurenate analog SZR-72 prevents the nitroglycerol-induced increase of c-fos immunoreactivity in the rat caudal trigeminal nucleus: comparative studies of the effects of SZR-72 and kynurenic acid. *Neurosci. Res.* 61, 429–432. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.04.009>
- Kovács, V., Remzső, G., Körmöczi, T., Berkecz, R., Tóth-Szűki, V., Péntes, A., Vécsei, L., Domoki, F., 2021. The Kynurenic Acid Analog SZR72 Enhances Neuronal Activity after Asphyxia but Is Not Neuroprotective in a Translational Model of Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4822. <https://doi.org/10.3390/ijms22094822>

- Ladagu, A.D., Olopade, F.E., Adejare, A., Olopade, J.O., 2023. GluN2A and GluN2B N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDARs) Subunits: Their Roles and Therapeutic Antagonists in Neurological Diseases. *Pharm. Basel Switz.* 16, 1535. <https://doi.org/10.3390/ph16111535>
- Lajkó, N., Kata, D., Szabó, M., Mátyás, A., Dulka, K., Földesi, I., Fülöp, F., Gulya, K., Vécsei, L., Mihály, A., 2020. Sensitivity of Rodent Microglia to Kynurenines in Models of Epilepsy and Inflammation In Vivo and In Vitro: Microglia Activation Is Inhibited by Kynurenic Acid and the Synthetic Analogue SZR104. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9333. <https://doi.org/10.3390/ijms21239333>
- Lambuk, L., Jafri, A.J.A., Arfuzir, N.N.N., Iezhitsa, I., Agarwal, R., Rozali, K.N.B., Agarwal, P., Bakar, N.S., Kutty, M.K., Yusof, A.P.M., Krasilnikova, A., Spasov, A., Ozerov, A., Ismail, N.M., 2017. Neuroprotective Effect of Magnesium Acetyltaurate Against NMDA-Induced Excitotoxicity in Rat Retina. *Neurotox. Res.* 31, 31–45. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9658-9>
- Lapin, I.P., 1983. Antagonism of kynurenine-induced seizures by picolinic, kynurenic and xanthurenic acids. *J. Neural Transm.* 56, 177–185. <https://doi.org/10.1007/BF01243276>
- Li, J.H., Wang, Y.H., Wolfe, B.B., Krueger, K.E., Corsi, L., Stocca, G., Vicini, S., 1998. Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1704–1715. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00169.x>
- Linderholm, K.R., Skogh, E., Olsson, S.K., Dahl, M.-L., Holtze, M., Engberg, G., Samuelsson, M., Erhardt, S., 2012. Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 38, 426–432. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq086>
- Liu, X.-B., Murray, K.D., Jones, E.G., 2004. Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *J. Neurosci.* 24, 8885–8895. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2476-04.2004>
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., Wang, Y.T., 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2846–2857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007>
- Liu, Z., Stafstrom, C.E., Sarkisian, M., Tandon, P., Yang, Y., Hori, A., Holmes, G.L., 1996. Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 97, 178–184. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00141-1](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00141-1)
- Lu, J., Zhuang, H., Mao, W., Yi, X., Jin, G., 2020. Glutamate influences neuronal differentiation of neural stem cells from the injured cortex of adult rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 13, 8369–8380.
- Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñiz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverrí, J., Silva-Adaya, D., Maldonado, P.D., Torres, I., Pinzón, E., Ortiz-Islas, E., López, T., García, E., Pineda, B., Torres-Ramos, M., Santamaría, A., La Cruz, V.P.-D., 2011. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.07.002>

- Lukács, M., Warfvinge, K., Tajti, J., Fülöp, F., Toldi, J., Vécsei, L., Edvinsson, L., 2017. Topical dura mater application of CFA induces enhanced expression of c-fos and glutamate in rat trigeminal nucleus caudalis: attenuated by KYNA derivate (SZR72). *J. Headache Pain* 18, 39. <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0746-x>
- Luo, Y., Zhang, Y., Zhao, Y., Chen, F., Li, X., Liu, X., Shakir, M.Z., Jiang, N., Shan, C., 2025. Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Anxiety is Linked to Inflammatory Responses and Disruptions in Tryptophan Metabolism in Male C57BL/6N Mice. *Behav. Brain Res.* 115506. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2025.115506>
- Maddison, D.C., Giorgini, F., 2015. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Semin. Cell Dev. Biol., Extracellular vesicles: a paradigm shift in how we think about cell-cell communication & Molecular neuroprotection* 40, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2015.03.002>
- Maitre, M., Taleb, O., Jeltsch-David, H., Klein, C., Mensah-Nyagan, A.-G., 2024. Xanthurenic acid: A role in brain intercellular signaling. *J. Neurochem.* 168, 2303–2315. <https://doi.org/10.1111/jnc.16099>
- Malina, H.Z., Martin, X.D., 1996. 3-hydroxykynurenine transamination leads to the formation of the fluorescent substances in human lenses. *Eur. J. Ophthalmol.* 6, 250–256. <https://doi.org/10.1177/112067219600600305>
- Mangia, S., Giove, F., Dinuzzo, M., 2012. Metabolic pathways and activity-dependent modulation of glutamate concentration in the human brain. *Neurochem. Res.* 37, 2554–2561. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0848-4>
- McEntee, W.J., Crook, T.H., 1993. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl.)* 111, 391–401. <https://doi.org/10.1007/BF02253527>
- Mo, X., Pi, L., Yang, J., Xiang, Z., Tang, A., 2014. Serum indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine aminotransferase enzyme activity in patients with ischemic stroke. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 21, 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.08.020>
- Mohrmann, R., Hatt, H., Gottmann, K., 2000. Developmental regulation of subunit composition of extrasynaptic NMDA receptors in neocortical neurones. *Neuroreport* 11, 1203–1208. <https://doi.org/10.1097/00001756-200004270-00012>
- Molnár, K., Lőrinczi, B., Fazakas, C., Szatmári, I., Fülöp, F., Kmetykó, N., Berkecz, R., Ilisz, I., Krizbai, I.A., Wilhelm, I., Vécsei, L., 2021. SZR-104, a Novel Kynurenic Acid Analogue with High Permeability through the Blood–Brain Barrier. *Pharmaceutics* 13, 61. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010061>
- Müller, A.C., Maharaj, H., Maharaj, D.S., Daya, S., 2005. Aciclovir protects against quinolinic-acid-induced oxidative neurotoxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 883–888. <https://doi.org/10.1211/0022357056442>
- Muneer, A., 2020. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiologic and Therapeutic Considerations. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci. Off. Sci. J. Korean Coll. Neuropsychopharmacol.* 18, 507–526. <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.4.507>
- Nagy, K., Plangár, I., Tuka, B., Gellért, L., Varga, D., Demeter, I., Farkas, T., Kis, Z., Marosi, M., Zádori, D., Klivényi, P., Fülöp, F., Szatmári, I., Vécsei, L., Toldi, J., 2011. Synthesis

- and biological effects of some kynurenic acid analogs. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 7590–7596. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.029>
- Nematollahi, A., Sun, G., Jayawickrama, G.S., Church, W.B., 2016. Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 946. <https://doi.org/10.3390/ijms17060946>
- Nikkheslat, N., Zunszain, P.A., Horowitz, M.A., Barbosa, I.G., Parker, J.A., Myint, A.-M., Schwarz, M.J., Tylee, A.T., Carvalho, L.A., Pariante, C.M., 2015. Insufficient glucocorticoid signaling and elevated inflammation in coronary heart disease patients with comorbid depression. *Brain. Behav. Immun.* 48, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.002>
- Ogawa, T., Matson, W.R., Beal, M.F., Myers, R.H., Bird, E.D., Milbury, P., Saso, S., 1992. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42, 1702–1706. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.9.1702>
- Ogita, K., Okuda, H., Yamamoto, Y., Nishiyama, N., Yoneda, Y., 2003. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurochem.* 85, 1336–1346. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01778.x>
- Ostapiuk, A., Urbanska, E.M., 2021. Kynurenic acid in neurodegenerative disorders—unique neuroprotection or double-edged sword? *CNS Neurosci. Ther.* 28, 19–35. <https://doi.org/10.1111/cns.13768>
- Park, L.T., Kadriu, B., Gould, T.D., Zanos, P., Greenstein, D., Evans, J.W., Yuan, P., Farmer, C.A., Oppenheimer, M., George, J.M., Adejo, L.W., Snodgrass, H.R., Smith, M.A., Henter, I.D., Machado-Vieira, R., Mannes, A.J., Zarate, C.A., 2020. A Randomized Trial of the N-Methyl-d-Aspartate Receptor Glycine Site Antagonist Prodrug 4-Chlorokynurenine in Treatment-Resistant Depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 23, 417–425. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa025>
- Platten, M., Nollen, E.A.A., Röhrig, U.F., Fallarino, F., Opitz, C.A., 2019. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 379–401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>
- Platzer, M., Dalkner, N., Fellendorf, F.T., Birner, A., Bengesser, S.A., Queissner, R., Kainzbauer, N., Pilz, R., Herzog-Eberhard, S., Hamm, C., Hörmanseder, C., Maget, A., Rauch, P., Mangge, H., Fuchs, D., Zelzer, S., Schütze, G., Moll, N., Schwarz, M.J., Mansur, R.B., McIntyre, R.S., Reininghaus, E.Z., 2017. Tryptophan breakdown and cognition in bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology* 81, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.04.015>
- Pocivavsek, A., Schwarcz, R., Erhardt, S., 2024. Neuroactive Kynurenines as Pharmacological Targets: New Experimental Tools and Exciting Therapeutic Opportunities. *Pharmacol. Rev.* 76, 978–1008. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.124.000239>
- Poles, M.Z., Nászai, A., Gulácsi, L., Czakó, B.L., Gál, K.G., Glenz, R.J., Dookhun, D., Rutai, A., Tallósy, S.P., Szabó, A., Lőrinczi, B., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Boros, M., Juhász, L., Kaszaki, J., 2021. Kynurenic Acid and Its Synthetic Derivatives Protect Against Sepsis-Associated Neutrophil Activation and Brain Mitochondrial Dysfunction in Rats. *Front. Immunol.* 12, 717157. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717157>

- Prasher, P., Sharma, M., 2021. Medicinal chemistry of anthranilic acid derivatives: A mini review. *Drug Dev. Res.* 82, 945–958. <https://doi.org/10.1002/ddr.21842>
- Prescott, C., Weeks, A.M., Staley, K.J., Partin, K.M., 2006. Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neurosci. Lett.* 402, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.051>
- Pukoli, D., Vécsei, L., 2023. Smouldering Lesion in MS: Microglia, Lymphocytes and Pathobiochemical Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 12631. <https://doi.org/10.3390/ijms241612631>
- Rejdak, K., Petzold, A., Kocki, T., Kurzepa, J., Grieb, P., Turski, W.A., Stelmasiak, Z., 2007. Astrocytic activation in relation to inflammatory markers during clinical exacerbation of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 114, 1011–1015. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0667-y>
- Ribeiro, F.M., Vieira, L.B., Pires, R.G.W., Olmo, R.P., Ferguson, S.S.G., 2017. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* 115, 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.013>
- Rózsa, E., Robotka, H., Vécsei, L., Toldi, J., 2008. The Janus-face kynurenic acid. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 115, 1087–1091. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0052-5>
- Samavati, R., Zádor, F., Szűcs, E., Tuka, B., Martos, D., Veres, G., Gáspár, R., Mándity, I.M., Fülöp, F., Vécsei, L., Benyhe, S., Borsodi, A., 2017. Kynurenic acid and its analogue can alter the opioid receptor G-protein signaling after acute treatment via NMDA receptor in rat cortex and striatum. *J. Neurol. Sci.* 376, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.02.053>
- Savitz, J., Dantzer, R., Meier, T.B., Wurfel, B.E., Victor, T.A., McIntosh, S.A., Ford, B.N., Morris, H.M., Bodurka, J., Teague, T.K., Drevets, W.C., 2015. Activation of the kynurenine pathway is associated with striatal volume in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 62, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.07.609>
- Schwarcz, R., Bruno, J.P., Muchowski, P.J., Wu, H.-Q., 2012. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 465–477. <https://doi.org/10.1038/nrn3257>
- Schwarcz, R., Guidetti, P., Sathyaikumar, K.V., Muchowski, P.J., 2010. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 90, 230–245. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.005>
- Sheldon, A.L., Robinson, M.B., 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51, 333–355. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.03.012>
- Siman, R., Noszek, J.C., Kegerise, C., 1989. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 1579–1590. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-05-01579.1989>
- Simonson, L., Baudry, M., Siman, R., Lynch, G., 1985. Regional distribution of soluble calcium activated proteinase activity in neonatal and adult rat brain. *Brain Res.* 327, 153–159. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91509-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91509-4)

- Smith, J.R., Jamie, J.F., Guillemin, G.J., 2016. Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discov. Today* 21, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.001>
- Stone, T.W., 2020. Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *J. Neurochem.* 152, 627–649. <https://doi.org/10.1111/jnc.14907>
- Stone, T.W., Darlington, L.G., 2002. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 609–620. <https://doi.org/10.1038/nrd870>
- Stoy, N., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T.W., Darlington, L.G., 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J. Neurochem.* 93, 611–623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03070.x>
- Stroebel, D., Mony, L., Paoletti, P., 2021. Glycine agonism in ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 193, 108631. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108631>
- Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., Shiro, Y., 2006. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2611–2616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508996103>
- Sun, C., Fukushi, Y., Wang, Y., Yamamoto, S., 2018. Astrocytes Protect Neurons in the Hippocampal CA3 Against Ischemia by Suppressing the Intracellular Ca²⁺ Overload. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 280. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00280>
- Szabo, M., Lajkó, N., Dulka, K., Barczánfalvi, G., Lőrinczi, B., Szatmári, I., Mihály, A., Vécsei, L., Gulya, K., 2023. The kynurenic acid analog SZR104 induces cytomorphological changes associated with the anti-inflammatory phenotype in cultured microglia. *Sci. Rep.* 13, 11328. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38107-8>
- Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P., Tew, K.D., 2002. II. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 56, 446–457. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00285-8)
- TATA, D.A., YAMAMOTO, B.K., 2008. Chronic Stress Enhances Methamphetamine-Induced Extracellular Glutamate and Excitotoxicity in the Rat Striatum. *Synap. N. Y. N* 62, 325–336. <https://doi.org/10.1002/syn.20497>
- Török, N., Tanaka, M., Vécsei, L., 2020. Searching for Peripheral Biomarkers in Neurodegenerative Diseases: The Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9338. <https://doi.org/10.3390/ijms21249338>
- Tyce, G.M., 1990. Origin and metabolism of serotonin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 Suppl 3, S1-7.
- Urbańska, E.M., Luchowski, P., Luchowska, E., Pniewski, J., Woźniak, R., Chodakowska-Zebrowska, M., Lazarewicz, J., 2006. Serum kynurenic acid positively correlates with cardiovascular disease risk factor, homocysteine: a study in stroke patients. *Pharmacol. Rep. PR* 58, 507–511.
- Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., Toldi, J., 2013. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 64–82. <https://doi.org/10.1038/nrd3793>
- Veres, G., Fejes-Szabó, A., Zádori, D., Nagy-Grócz, G., László, A.M., Bajtai, A., Mándity, I., Szentirmai, M., Bohár, Z., Laborc, K., Szatmári, I., Fülöp, F., Vécsei, L., Párdutz, Á.,

2017. A comparative assessment of two kynurenic acid analogs in the formalin model of trigeminal activation: a behavioral, immunohistochemical and pharmacokinetic study. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 124, 99–112. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1615-5>
- Vinet, J., Weering, H.R.J. van, Heinrich, A., Kälin, R.E., Wegner, A., Brouwer, N., Heppner, F.L., Rooijen, N. van, Boddeke, H.W.G.M., Biber, K., 2012. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J. Neuroinflammation* 9, 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-27>
- Vyklický, L., 1993. Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 470, 575–600.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., Vyklicky, L., 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol. Res.* 63, S191-203. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>
- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., Ling, L., 2006. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35*. *J. Biol. Chem.* 281, 22021–22028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200>
- Wennström, M., Nielsen, H.M., Orhan, F., Londos, E., Minthon, L., Erhardt, S., 2014. Kynurenic Acid levels in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease or dementia with lewy bodies. *Int. J. Tryptophan Res. IJTR* 7, 1–7. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S13958>
- Yang, Q., Zhang, Y., Yang, K., Niu, Y., Fan, F., Chen, S., Luo, X., Tan, S., Wang, Z., Tong, J., Yang, F., Li, C.-S.R., Tan, Y., 2022. Associations of the serum kynurenine pathway metabolites with P50 auditory gating in non-smoking patients with first-episode schizophrenia. *Front. Psychiatry* 13, 1036421. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.1036421>
- Young, C., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W., 2004. Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia. *Curr. Mol. Med.* 4, 77–85. <https://doi.org/10.2174/1566524043479158>
- Young, K.D., Drevets, W.C., Dantzer, R., Teague, T.K., Bodurka, J., Savitz, J., 2016. Kynurenine pathway metabolites are associated with hippocampal activity during autobiographical memory recall in patients with depression. *Brain. Behav. Immun.* 56, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.007>
- Yu, S.P., Jiang, M.Q., Shim, S.S., Pourkhodad, S., Wei, L., 2023. Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: implications for preventive treatments of ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 18, 43. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00636-1>
- Zádori, D., Ilisz, I., Klivényi, P., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., Vécsei, L., Péter, A., 2011a. Time-course of kynurenic acid concentration in mouse serum following the administration of a novel kynurenic acid analog. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 540–543. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.02.014>
- Zádori, D., Nyiri, G., Szonyi, A., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., Freund, T.F., Vécsei, L., Klivényi, P., 2011b. Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a

transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neural Transm.* Vienna Austria 1996 118, 865–875. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0573-6>

Zádori, D., Veres, G., Szalárdy, L., Klivényi, P., Vécsei, L., 2018. Alzheimer's Disease: Recent Concepts on the Relation of Mitochondrial Disturbances, Excitotoxicity, Neuroinflammation, and Kynurenines. *J. Alzheimers Dis. JAD* 62, 523–547. <https://doi.org/10.3233/JAD-170929>

Zhou, L., Lin, D., Xu, G., Wang, X., Chen, Z., Wang, D., Fan, H., 2023. Alteration of neurofilament heavy chain and its phosphoforms reveals early subcellular damage beyond the optic nerve head in glaucoma. *Front. Neurol.* 14, 1091697. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1091697>

Zhou, M., Baudry, M., 2006. Developmental Changes in NMDA Neurotoxicity Reflect Developmental Changes in Subunit Composition of NMDA Receptors. *J. Neurosci.* 26, 2956–2963. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4299-05.2006>

12. Összefoglaló

A triptofán (Trp) metabolizmusának egyik fő útvonala a kinurenin-útvonal (KP), amely során számos neuroaktív hatással rendelkező anyagcseretermék keletkezik. A KP egyik legfontosabb neuroprotektív metabolitja a jelen értekezés középpontjában álló kinurénsav (KYNA). A KYNA jellegzetes tulajdonsága a Janus-arcú jellege: dózistól függően képes gátló és facilitáló módon hatni többféle, köztük a N-metil-D-aszpartát (NMDA) és a nem-NMDA típusú receptorokon. Legfontosabb farmakodinámiás tulajdonsága, hogy az NMDA-receptorok (NMDAR) szelektív antagonistájaként funkcionál.

A KYNA egyensúlyának szerepét több neurológiai kórképben is kimutatták: csökkent KYNA-szintet találtak például Alzheimer-, Huntington- és Parkinson-kór esetén, míg emelkedett értékeket detektáltak skizofréniában és szklerózis multiplexben szenvedőknél. A KYNA pótlása ígéretes lehetőséget jelenthet egyes neurodegeneratív betegségek kezelésében, ugyanakkor alkalmazását nagyban korlátozza, hogy csak kis mértékben képes penetrálni a vér-agy gáton (BBB).

Ezen akadály leküzdésére több módszer is vizsgálat alatt áll, például nanopartikulum-alapú szállítórendszerek, amelyek közvetlenül a központi idegrendszerbe (CNS) juttatják a KYNA-t, vagy olyan kémiaiilag módosított KYNA-analógok, amelyek hasonló farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek, de nagyobb arányban képesek penetrálni a BBB-on. Két ígéretes KYNA-analóg az SZR72 és az SZR104, amelyek neuroprotektív hatását az elmúlt években számos állatkísérletes modellben igazolták. Az SZR72 hatásosnak bizonyult szepszis, iszkémia és migrén modellekben, bár pontos hatásmechanizmusát még nem írták le. Az SZR104 a KYNA-hoz hasonlóan az NMDAR-ok szelektív antagonistájaként fejt ki hatását, és az analóg protektívnek bizonyult többek között szepszis és epileptiform görcsök esetén is.

Habár a KYNA és említett analógjai neuroprotektív hatásait a szakirodalom viszonylag széles körben vizsgálta, számos, a terápiás alkalmazás szempontjából lényeges kérdés továbbra is nyitott. Egy ilyen kevésbé kutatott, ám fontos aspektus a KYNA, az SZR72 és az SZR104 farmakológiai hatásának és feltételezett hatásmechanizmusának alakulása különböző életkorokban. Jelenleg nem áll rendelkezésre adat arra vonatkozóan, hogy az életkori különbségek milyen mértékben befolyásolják a KYNA, SZR72 és SZR104 protektív hatásait, különös tekintettel a fejlődő

és felnőtt állatok CNS-ében. Pedig ez különösen fontos lehet a jövőbeli, korcsoport-specifikus terápiás alkalmazások megtervezéséhez.

Fiziológiás körülmények között a glutamát (Glu) a CNS fő serkentő neurotranszmittere, azonban patológiás állapotokban túlzott felszabadulása excitotoxicitást indukálhat, elsősorban az NMDA- és 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav (AMPA) receptorokon keresztül. A neurodegeneratív betegségek egyik kulcsfontosságú patomechanizmusa éppen a Glu-indukálta excitotoxicitás. Ennek során a szinaptikus résben felhalmozódó Glu tartós aktivációban tartja a poszt-szinaptikus neuronokat, amelyekbe jelentős mennyiségű Ca^{2+} áramlik. A megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -szint olyan jelátviteli utakat aktivál, amelyek sejtpusztulást idéznek elő. A szakirodalmi adatok ellentmondásosak az excitotoxicitás életkorfüggő aspektusait illetően: egyes vizsgálatok a fiatal, míg mások a felnőtt állatok fokozott érzékenységről számolnak be excitatorikus anyagokkal szemben.

Laboratóriumi körülmények között az NMDA az egyik leggyakrabban alkalmazott szer az excitotoxicitás kiváltására. Hatása hasonló a Glu-hoz, azonban az NMDAR-ok szelektív agonistájaként működik. Hatását nagyban befolyásolja az alkalmazott dózisa, az expozíció időtartama, valamint a használt kísérleti modell jellege.

Munkánk során célul tűztük ki az NMDA-indukálta excitotoxicitás életkorfüggő vizsgálatát *in vitro* és *in vivo* körülmények között, valamint a KYNA, SZR72 és SZR104 neuromoduláló hatásának tanulmányozását ebben a modellben, egér hippocampusban.

Kísérleteink alátámasztják a szakirodalmi adatokat, miszerint az NMDA alkalmas excitotoxicitás indukálására már alacsony koncentrációban is. Akutagyszelet-preparátumokon végzett *in vitro* kísérleteink azt mutatták, hogy az NMDA-indukálta excitotoxicitással szemben a felnőtt állatok hippocampusza szignifikánsan szenzitívebb, mint a fiatal állatoké. Habár esetükben is megindul a sejthalál folyamata, ami feltehetően késleltetve következik be. Az NMDA intraperitoneális alkalmazását követően azonban egyik korcsoport esetében sem volt megfigyelhető az excitotoxicitás folyamata; nem detektáltunk sejthalált. Az NMDA beadását követően asztrogliózis folyamata sem indult meg a vizsgált agyterületen sem fiatal, sem pedig felnőtt korcsoport esetében. Feltételezhető, hogy az NMDA csak kis mértékben képes penetrálni a BBB-on, ami nem elegendő ahhoz, hogy kiváltsa az excitotoxicitást.

Kis térfogatú inkubációs rendszerben végzett kísérletek bizonyították a KYNA és az SZR72 neuroprotektív hatását felnőtt állatok esetében az excitotoxicitás-modellben. Ezzel szemben az SZR104 jelű analóg nem volt képes modulálni az NMDA excitotoxikus hatását, annak ellenére, hogy jelenleg az egyik legígéretesebb neuroprotektív hatású KYNA-analógnak tartják számon a szakirodalomban. Fiatal állatok esetében sem a KYNA, sem analógjai nem okoztak szignifikáns változást az NMDA-kezelt csoportokhoz képest. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a KYNA és az SZR72 alkalmazása késlelteti ugyan az excitotoxicitás okozta sejthalál bekövetkeztét, azonban nem képes teljesen megakadályozni azt.

In vitro körülmények között végzett kísérleteink során igazoltuk, hogy a KYNA dózisfüggő kettős hatással rendelkezik: alacsony nanomólos koncentrációban neuroprotektív, még magasabb nanomólos koncentrációban hatástalan, vagy pedig tovább fokozza az NMDA-indukálta sejtkárosodás mértékét. Az SZR72 alkalmazott koncentrációjától függetlenül neuroprotektív hatással rendelkezik, míg az SZR104 a legtöbb vizsgált koncentrációban hatástalan, csak magasabb nanomólos dózisban volt képes neuroprotektív hatást kifejteni.

Kísérletes munkám összegzéseként elmondható, hogy *in vitro* és *in vivo* körülmények között az NMDA eltérő farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik. A különböző korú egerek agyából származó agyszövetek eltérő érzékenységgel reagálnak a toxikus anyagra *in vitro*; a fiatal állatok rezisztensebbek, mint a felnőtt egyedek. Kutatócsoportunk elsőként vizsgálta az SZR72 és az SZR104-es jelű KYNA-analógok neurodmoduláló hatását különböző korú egerek agyszövetein, valamint ezen analógok potenciális dózisfüggő hatásait is. Habár eredményeink hiánypótlóak a szakirodalomban, további molekuláris biológiai és funkcionális vizsgálatok indokoltak a témában, *in vitro* és *in vivo* modellekben egyaránt.

Összefoglalásként elmondható, hogy kísérleteink hiánypótló adatokat szolgáltathatnak a KYNA-hoz köthető klinikai felhasználhatóság vizsgálatához, különös tekintettel a korfüggő különbségekre, valamint az SZR72 és SZR104 analógok farmakokinetikai tulajdonságaira, ezáltal lényeges alapot jelenthetnek a kinurenerg célpontú terápiás stratégiák fejlesztéséhez a jövőben.

13. Summary

The most important metabolic pathway for tryptophan (Trp) is the kynurenine pathway (KP). This metabolic pathway produces a set of neuroactive substances called kynurenines. The best-studied neuroprotective metabolite of the KP is kynurenic acid (KYNA), which is the subject of this dissertation. KYNA is characterized by its Janus-faced nature, exhibiting dose-dependent inhibitory or facilitatory effects on a range of receptors, including N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors. However, its most important pharmacodynamic feature is that it acts as an NMDA receptor (NMDAR) antagonist.

KYNA homeostasis plays a key role in the pathogenesis of various diseases: a reduced level of KYNA was observed in neurodegenerative diseases (e.g., Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease), and KYNA levels were significantly elevated in psychiatric diseases (e.g., depression, schizophrenia). Because of its potential protective effects, KYNA is being explored as a possible treatment for neurodegenerative diseases. The major limitation of applying KYNA is its poor ability to cross the blood-brain barrier (BBB).

Several methods are being investigated to overcome this barrier, e.g., nanoparticle-delivery systems that deliver KYNA directly to the central nervous system (CNS) and chemically modified KYNA analogues that are pharmacokinetically equivalent to KYNA but with better BBB penetration capacity. Two such promising KYNA analogues are SZR72 and SZR104, their protective effects have been proved in several animal models recently. SZR72 has been shown to be protective in models of sepsis, ischaemia and migraine, but its exact mechanism of action is yet to be determined. SZR104 is likely to have a similar effect to KYNA, as it also acts as a selective antagonist of NMDARs, and the analogue has shown its protective effect against sepsis and epileptic seizures, among others.

Investigation of the neuroprotective properties of KYNA and its analogues has attracted considerable attention, but some key therapeutic aspects remain unclear. One important area involves how the therapeutic mechanisms and pharmacological effects of KYNA, SZR72, and SZR104 vary across developmental stages. At present, there is limited scientific data on how age-related factors influence the protective effects of these

compounds in the juvenile versus adult CNS. Understanding these differences could play a key role in developing age-specific treatments.

Under physiological conditions, glutamate (Glu) functions as the primary excitatory neurotransmitter in the CNS. However, under pathological conditions, excessive Glu release can lead to excitotoxicity, especially through the overactivation of NMDA and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. Glu-mediated excitotoxicity is an important pathomechanism of neurodegenerative diseases. In the process, Glu, which has been built up in the synaptic cleft, keeps the postsynaptic neurons in an extended activation state, allowing a large amount of calcium ions (Ca^{2+}) to enter. The resulting higher intracellular Ca^{2+} level activates signaling pathways that lead to cell death. There is no scientific consensus on the age-dependent aspects of excitotoxicity: while some studies suggest that younger animals are more vulnerable, others indicate greater sensitivity in adult animals.

Under experimental conditions, NMDA is one of the most commonly used agents to induce excitotoxicity. Its effect is similar to that of Glu, although it selectively activates NMDAR and is classified as an NMDA agonist. The extent of its effect is dependent on the administered dose, the time of exposure, and the specific model or organism used for the experiment.

In the present studies, we intended to explore the age-related *in vitro* and *in vivo* analysis of NMDA-induced excitotoxicity and to investigate the neuromodulatory effect of KYNA, SZR72, and SZR104 in this excitotoxicity model in the mouse hippocampus.

Our experimental findings align with existing literature: NMDA is capable of inducing excitotoxicity even at low concentrations. Our *in vitro* experiments on acute brain slice preparations showed that the hippocampus of adult animals is significantly more susceptible to NMDA-induced excitotoxicity than that of young animals. While cell death processes are also activated in young animals, it appears that there is a delay. In contrast, no cell death was observed in any age group following intraperitoneal administration of NMDA. Additionally, there was no sign of astrogliosis in the examined brain regions of either young or adult animals following NMDA administration. Overall, our results support the widely held view that NMDA crosses the BBB poorly, likely entering the brain in quantities too low to induce excitotoxicity.

In our low-volume incubation system, experiments demonstrated the neuroprotective activity of KYNA and SZR72 in adult animals in the excitotoxicity model. However, unlike KYNA and SZR72, the analogue SZR104 was unable to modulate the excitotoxic effect of NMDA. Despite this, it is currently considered to be one of the most promising neuroprotective KYNA analogues in scientific literature. Neither KYNA nor its analogues elicited significant changes compared to NMDA-treated juvenile animals. Based on our study, we presume that treatment with KYNA and SZR72 suppresses, but does not completely prevent, the process of excitotoxicity-induced cell death.

In our experiments under *in vitro* conditions, we demonstrated that KYNA has a dose-dependent dual effect: it is neuroprotective at low nanomolar concentrations, ineffective at even higher nanomolar concentrations, or it further enhances NMDA-induced cell damage. SZR72 has neuroprotective effects at all concentrations tested, whereas SZR104 is ineffective at most concentrations tested, providing neuroprotection only at higher nanomolar concentrations.

In summary, our experimental studies demonstrate that NMDA possesses certain pharmacokinetic features under *in vitro* and *in vivo* settings. Mouse brain tissue of different ages reacts differently to the neurotoxic substance under *in vitro* conditions; young animals are more resistant than adult animals. Our research team has for the first time examined the neuromodulatory effects of the KYNA analogues SZR72 and SZR104 on the brain tissue from mice of different ages, as well as the dose-dependent activity of these analogues. Although our data fills a gap in the literature, additional molecular biological and functional studies on this topic in both the *in vitro* and *in vivo* models are needed.

In general, our experimental results, particularly regarding the pharmacodynamic properties and age-related variations of the SZR72 and SZR104 analogues fill the gap in data on the clinical relevance of KYNA. These results may also provide a solid foundation for developing future kynurenergic therapeutic modalities.

14. Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10083648

A doktori eljárás alapját képező közlemények:

Age-dependent changes in NMDA-induced excitotoxicity and neuromodulatory effects of kynurenic acid and its analogue in mouse brain slices

Emma Balog, Gyula Jenei, Anikó Magyariné Berkó, Bálint Lőrinczi, István Szatmári, László Vécsei, József Toldi, Zsolt Kis

Neuroscience Letters, 2025 Mar 26;854:138220. doi: 10.1016/j.neulet.2025.138220.

IF: 2,0

Species-specific neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the mouse cerebellum

Emma Balog*, Gyula Jenei*, Levente Gellért, Etsuro Ono, László Vécsei, József Toldi, Zsolt Kis

*társelsőszerzők

Neurochemistry International, 2021 Jan;142:104920. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104920.

IF: 4,297

A doktori eljárás alapját képező közlemények összesített impakt faktora: **6,297**

Beküldött közlemény:

Expression of Kynurenine Aminotransferase-2 in Different Mouse Brain-Derived Cells: A Comprehensive Study in Cell Cultures

Gyula Jenei, Emma Balog, István Pesti, József Toldi, László Vécsei, Zsolt Kis

A doktori értekezéshez témájához kapcsolódó magyar és nemzetközi konferenciák:

1. Age-dependent changes in NMDA-induced excitotoxicity and neuromodulatory effects of kynurenic acid and its analogues in mouse brain slice

Emma Balog, Gyula Jenei, Anikó Magyariné Berkó, József Toldi, Zsolt Kis

INC 2024, Pécs, 2024. január 25-26., poszter szekció

2. Age-dependent changes in NMDA-induced excitotoxicity and neuroprotective effect of kynurenic acid in mouse brain tissue

Emma Balog, Gyula Jenei, Anikó Magyariné Berkó, József Toldi, Zsolt Kis

MITT-ANA 2023, Budapest, 2023. február 01-03., poszter szekció

3. A kinurénsav és analógjai neuromoduláló hatásának vizsgálata N-metil-D-aszpartáttal kiváltott excitotoxicitással szemben egér agyszöveten

Balog Emma

ELTE Kárpát-medencei Nyári Egyetem, online, 2021. július 08., előadás

Egyéb magyar és nemzetközi konferenciák:

1. Investigating the expression of kynurenine aminotransferase-2 in primary cell cultures

Gyula Jenei, Emma Balog, József Toldi, Zsolt Kis

MITT-ANA 2023, Budapest, 2023. február 01-03., poszter szekció

2. Cell-type-specific localization of kynurenine aminotransferase-2 in the mouse brain

Gyula Jenei, Emma Balog, Zsolt Kis, József Toldi, László Vécsei

FENS 2021, online, 2021. augusztus 25-27., poszter szekció