

Doktori értekezés tézisei

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

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. Bevezetés

A triptofán (Trp) metabolizmusának fő útvonala a kinurenin-útvonal (KP), melynek eredményeként számos neuroaktív anyagcseretermék keletkezik, ezeket kinurenineknek nevezzük. A kinureninek részt vesznek a neurotranszmisszióban, neuroinflammációban és az oxidatív stressz szabályozásában is. Az egyik legszéleskörűbben vizsgált KP metabolit a neuroprotektív hatású kinurénsav (KYNA), amelynek hatását több állatkísérletes modellben igazolták. A KYNA az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok (NMDAR) antagonistájaként képes a receptorok egyes számú alegységének glicinkötő helyére bekötődni. A KYNA képes hatást kifejteni nem-NMDA típusú receptorokon is: antagonistá az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptorokon, agonista hatású az aril-hidrokarbon és G-protein-kapcsolt receptor 35-ön. A szakirodalomban leírták a KYNA Janus-arcúságát is: dóziszfüggő kettős hatással rendelkezik, az 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav (AMPA) receptorokon: mikromoláris koncentrációban gátló hatást fejt ki, míg nanomoláris koncentrációban elősegíti a serkentő posztzinaptikus potenciálokat. A KYNA fiziológiai körülmények között is megtalálható a szervezet legtöbb sejtjében, egyensúlyának felborulása különböző neurodegeneratív és pszichiátriai betegség kialakulásához vezethet: csökken a szintje különböző neurodegeneratív kórképekben (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór), míg pszichiátriai megbetegedések (például skizofrénia) esetén szintje megnövekszik. Habár a KYNA meghatározott koncentrációban igazoltan neuroprotektív, gyógyszerként a különböző neurodegeneratív megbetegedések kezelésére még nem használható, mivel csak kis mértékben képes átmenni a vér-agy gáton (BBB).

A KYNA központi idegrendszerbe (CNS) juttatására számos különböző stratégia áll laboratóriumi tesztelés alatt: ilyen például a KYNA nanopartikulumokban történő transzportja, illetve a kémiaiailag módosított analógjai. Cél egy olyan szintetikus analóg előállítása, amely a KYNA-hoz hasonlóan neuroprotektív hatással rendelkezik, azonban nagyobb mértékben képes penetrálni a BBB-n. A szakirodalom alapján két ígéretes analóg az SZR72 és az SZR104.

Az SZR72 pontos hatásmechanizmusa még nem tisztázott, hatása nagyban függhet a kísérleti modelltől, a vizsgált biológiai rendszertől és alkalmazott dózistól. Az SZR72 egy KYNA-amid, amely a kiinduló anyagnál hidrofilebb, így nagyobb arányban képes penetrálni a BBB-n. Az SZR72 képes imitálni a KYNA receptor antagonistá hatását, valamint feltételezhető az is, hogy az analóg a CNS-be jutva KYNA-vá alakul, így fejtve ki neuroprotektív hatását. Az SZR72 neuroprotektív hatását számos állatmodellben igazolták: szepszis, iszkémia és migrén modellekben. Az SZR104-et a szakirodalomban az egyik legígéretesebb BBB-permeabilis

KYNA-analóggént tartják számon. KYNA-hoz hasonló hatással rendelkezik: NMDAR sztrichnin-inszenzitív glicinkötő helyekhez kötődve fejt ki hatását, valamint képes a mikroglia aktiváció modulálására. A SZR104-es analóg számos kísérleti modellben (iszkémia, epileptiform görcsök, szepszis) bizonyította protektív hatását. **A KYNA dóziszfüggő kettős hatását már korábban leírták, de az analógok koncentráció-függéséről nincs adat a szakirodalomban. Terápiás potenciáljuk kapcsán célszerű lehet vizsgálni azt, hogy az egyes anyagok milyen hatást fejtenek ki különböző életkorú szervezetekben.**

A glutamát (Glu) a CNS legfontosabb serkentő neurotranszmittere, fiziológias körülmények között nélkülözhetetlen a szinaptikus plaszticitás, tanulás és memória folyamataiban. Ha a Glu egyensúlya felborul, a neurotranszmitter felhalmozódik a szinaptikus részben és excitotoxicitást okoz: ez a nagy mennyiségű Glu folyamatosan aktivált állapotban tartja a posztszinaptikus sejteket, amelyekbe nagy mennyiségű Ca^{2+} áramlik, ez olyan szignalizációs útvonalakat fog aktiválni, amelyek a sejtek halálát indukálják. Laboratóriumi körülmények között egyik leggyakrabban alkalmazott anyag az excitotoxicitás kiváltására az NMDA. Hatása hasonló a Glu-éhoz, azonban míg a Glu ionotróp és metabotróp receptorokon is fejt ki hatást, addig az NMDA az NMDAR-ok szelektív agonistája. Az NMDA hatását nagyban befolyásolja az alkalmazott dózisa és expozíciós ideje. **A szakirodalom ellentmondásos az NMDA-indukálta excitotoxicitás tekintetében: bizonyos modellekben a fiatal, más esetekben a felnőtt állatok mutatkoztak rezisztensebbnek az NMDA károsító hatásával szemben *in vitro* és *in vivo* körülmények között is.**

2. Célkitűzések

Kísérletes munkám fő célja a KYNA és analógjai neuromoduláló hatásának vizsgálata NMDA-indukálta excitotoxicitás modellben C57Bl/6 egerek agyszövetén *in vivo* és *in vitro* körülmények között. Célunk volt megvizsgálni az NMDA, KYNA és analógjai dózisfüggő, valamint életkor szerinti hatékonyságát.

1. Célkitűzés:

In vitro NMDA-indukálta excitotoxicitás modell létrehozása, vizsgálata és alkalmazása **különböző korú** egerek agyából készült akutagyszelet-preparátumokon, kis térfogatú inkubációs rendszerben.

2. Célkitűzés:

A KYNA és kémiaailag módosított analógjai (SZR72 és SZR104) neuromoduláló hatásának vizsgálata *in vitro* körülmények között NMDA-indukálta excitotoxicitás modellben, **különböző korú egerek** agyából származó akutagyszeleteken.

3. Célkitűzés:

A KYNA, az SZR72 és az SZR104 **dózisfüggő** hatásának vizsgálata fiatal felnőtt állatok agyából készült akutagyszelet-preparátumokon *in vitro* körülmények között.

4. Célkitűzés:

Intraperitoneálisan adott NMDA hatásának *in vivo* vizsgálata **különböző korú egerek** agyszövetében.

3. Anyagok és módszerek

Kísérleteinket különböző korú C57Bl/6 hím egereken (n=199) végeztük el. A kísérletek elvégzéséhez szükséges etikai engedély száma: XX. /495/2024.

3.1. Neuromoduláló anyagok *in vitro* vizsgálata

3.1.1. Agyszövet preparálás és inkubáció

Az állatokat izoflurán gázzal (3%) történő altatást követően dekapitáltuk, agyukat eltávolítottuk a koponyából. Az agyukból 350 μ m vastagságú koronális, hippokampális túlélő akutagyszelet-preparátumokat készítettünk, amelyeket 30 percig nagy térfogatú (300 ml mesterséges agy-gerincvelői folyadék (aCSF), 20 °C), folyamatosan oxigenizált rendszerbe helyeztünk. Ezt követően a neuromoduláló anyagok hatásának vizsgálata céljából egy, a kutatócsoportunk által kifejlesztett kis térfogatú (KT: 6 ml aCSF/3 koronális metszet, 32 °C) rendszerbe helyeztük az agyszeleteket, az inkubáció 4 órán át tartott. Az optimális NMDA koncentráció kiválasztásához különböző dózisait (10, 25, 50 és 100 μ M) használtuk, fiatal felnőtt állatok agyából származó metszeteken, melyeket kezeletlen, kontroll csoporttal vetettünk össze biokémiai és hisztológiai módszerekkel. A megfelelő NMDA-koncentráció (10 μ M) kiválasztását követően a KYNA és analógjai (SZR72, SZR104) neuromoduláló hatását vizsgáltuk 40 nM-os koncentrációban különböző korú (fiatal: 1- és 4 hetes; felnőtt: 8 hetes és 1 éves) állatok agyából származó szeleteken. A KYNA-t 1M NaOH-ban, míg az SZR72 és SZR104-es analógokat aCSF-ben oldottuk fel. A KYNA, SZR72 és SZR104 dózisfüggő hatásának vizsgálatát fiatal felnőtt egerek agyszövetein végeztük el, különböző koncentrációban (20, 40, 100, 500 nM és 8 μ M) alkalmazva 10 μ M NMDA-kezeléssel szemben. A kísérletet követően a felülúszót felhasználásig -80 °C-on tároltuk, az akutagyszelet-preparátumokat pedig hisztológiai vizsgálatoknak vetettük alá.

3.1.2. Biokémiai vizsgálatok

A KT rendszerből vett felülúszóból laktát-dehidrogenáz (LDH) szint meghatározást végeztünk a szöveti károsodás mértékének megállapítására. Az enzimkoncentrációkat LDH-aktivitásmérő reagens csomaggal 340 nm-en és 37 °C-on határoztuk meg. Az LDH-aktivitást U/l/100 mg szövet értékben fejeztük ki, az inkubáció során a rendszerünkben történő párolgást is figyelembe véve, a kapott értékeket ezzel normalizálva.

3.1.3. Hisztológiai vizsgálatok

Hisztológiai vizsgálatainkhoz 2-2 akutagyszelet-preparátumot egy éjszakán át 4 °C-on 4% paraformaldehidben (PFA) fixáltunk. Másnap foszfát pufferben (PB) mostuk, majd krioprotekció céljából 15%-os, majd 30%-os szacharóz oldatban inkubáltuk az agyszöveteket. A mintákat felhasználásukig 30%-os szacharóz oldatban -20 °C-on tároltuk. Végül 35 µm vastagságú szeleteket készítettünk fagyasztó mikrotom segítségével. A vizsgálatokhoz felhasznált agyszeletek a hippokampusz Ammon-szarvának (cornu ammonis, CA) CA1-es és CA3-as régióinak piramis sejtsorait vizsgáltuk.

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 pre-inkubációval, majd PBT-vel történő mosás után 1 órán keresztül 2%-os normál szamar szérumban (NDS) inkubáltuk. Blokkolást követően a szövetmintákat egy éjszakán át 4 °C-on elsődleges antitestet tartalmazó oldatban: egér anti-NeuN, 1:4000 és 1% NDS-t tartalmazó PBT-ben inkubáltuk. Másnap a szövetmintákat PBT-ben mostuk, majd 2 órán át szobahőmérsékleten fluorofórral kapcsolt szekunder antitestben (anti-egér AlexaFluor 488, 1:500) inkubáltuk.

Az immunhisztokémiai jelölés kvantifikációját a hippokampusz CA1-es régiójában egy 250 µm² méretű területen végeztük el és százalékosan ábrázoltuk. Minden vizsgált csoport esetében 3-6 agyszövetet vizsgáltunk.

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

A mintákat mindkét esetben Zeiss Axio Imager 2 mikroszkóppal vizualizáltuk.

3.2. 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 egerek. Vizsgálatainkhoz 75 mg/ttkg NMDA-t injektáltunk intraperitoneálisan (i.p.), kontroll csoportként 0,9 %-os fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk 20 ml/ttkg volumenben. Az oltást követően az állatokat folyamatos megfigyelés alatt tartottuk.

Az oltást követő 24. órában az állatoknak i.p. 25%-os uretánt (1,6g/ttkg) injektáltunk, ezután transzkardiális perfúziót végeztünk 4 °C-os PBS és 4%-os PFA oldatokkal. Ezután agyukat eltávolítottuk a koponyából és egy éjszakán át az agyakat immerziósan is fixáltuk. Ezt követően az agyakból 35 µm vastagságú metszeteket készítettünk vibratóm segítségével, ezeket a korábban ismertetett metodikák segítségével immunhisztokémiai (primer antitestek: NeuN 1:4000; GFAP 1:1000; szekunder antitestek: AlexaFluor 488 1:500, Cy3 1:500; sejtmagjelölés: DAPI 1:1000) és krezilibolya-festésnek vetettük alá. A hippocampusz CA1, CA3, CA4 és gyrus dentatus (GD) területeit Zeiss Axio Imager 2 mikroszkóppal vizualizáltuk.

4. Eredmények és tárgyalás

4.1. Neuromoduláló anyagok *in vitro* vizsgálata

4.1.1. NMDA-indukálta excitotoxicitás modell

Az optimális excitotoxicitás modell kiválasztásához az NMDA-t különböző koncentrációkban (10, 25, 50 és 100 μM) alkalmaztuk KT inkubációs rendszerben 4 órán keresztül. A szöveti károsodás mértékét biokémiai (LDH-szint) meghatározással a felülszóból, a szöveti integritást krezilibolya-festéssel vizsgáltuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy az NMDA-indukálta sérülés mértéke egyenesen arányos a koncentrációjának növelésével. A legszignifikánsabb károsodást az 50 és 100 μM -os dózisok indukálták, azonban jelentős sérülést detektáltunk alacsonyabb koncentrációk (10 és 25 μM) esetében is. Krezilibolya-festés alapján elmondható, hogy a CA1-es régió szenzitívebb az excitotoxicitásra, mint a CA3-as régió piramis sejtrétege: a CA1-es régió sejtszervi piknotikus, pontszerű megjelenést mutatnak, a sejtréteg denzitása a koncentráció növelésével egyre csökken. Ezzel szemben a CA3-as régió sejtszervi ép morfológiát mutatnak, a sejtréteg denzitása azonban csökken magasabb NMDA-koncentrációk esetén. Mindezek alapján további *in vitro* vizsgálatainkhoz a 10 μM -os NMDA koncentrációt alkalmaztuk az excitotoxicitás indukálására, mivel a magasabb dózisok olyan nagymértékű szöveti károsodást idéznek elő, amelyek nem teszik lehetővé a további hisztológiai, elsősorban immunhisztokémiai vizsgálatainkat.

4.1.2. NMDA-indukálta excitotoxicitás vizsgálata különböző korú állatok esetében

Kísérleteinket fiatal (1- és 4 hetes) és felnőtt (8 hetes és 1 éves) korú egerek agyából készült akutagyszelet-preparátumokon végeztük el KT rendszerben 4 órás inkubációt követően. Biokémiai vizsgálataink azt mutatták, hogy a fiatal állatcsoportok rezisztensebbek az excitotoxicitással szemben, felnőtt állatok esetében azonban szignifikáns LDH-felszabadulás volt megfigyelhető kontroll, kezeletlen csoportokhoz viszonyítva.

Hisztológiai vizsgálataink alátámasztották biokémiai vizsgálatainkat, az inkubációt követően a NeuN-immunjelölés nem mutatott sejthalált a *hippokampusz* CA1-es régiójában fiatal állatok esetében, bár a sejtréteg denzitása nem maradt teljesen intakt, a sejtszervi ép morfológiát mutattak. Ezzel szemben felnőtt állatok agyszöveteiben szignifikáns sejthalált detektáltunk, a sejtszervi morfológiája és a sejtréteg denzitása is sérült. Krezilibolya-festés során kiderült, hogy fiatal állatok *hippokampuszának* CA1-es régiójában is megindul ugyan a

sejtpusztulás folyamata, de ez feltehetően késleltetve történik meg. Felnőtt állatok esetében a sejtréteg denzitása csökkent, a sejtek piknotikusak, fiatalabb állatok agyszöveteiben is megfigyelhető a piknózis, azonban a sejtdenzitás megtartott.

4.1.3. 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 különböző életkorú állatok agyából származó agyszövetek esetében, KT inkubációs rendszerünkben.

Biokémiai vizsgálataink alapján elmondható, hogy sem a KYNA, sem pedig analógjai nem képesek fiatal állatok esetében modulálni az NMDA-okozta LDH-felszabadulás mértékét. Felnőtt korcsoportok esetén azonban az NMDA károsító hatásával szemben a KYNA- és az SZR72 is neuroprotektívnek bizonyult: szignifikáns csökkenést detektáltunk az LDH-felszabadulásban. NeuN-immunjelölés azt mutatta, hogy a KYNA- és az SZR72-kezelés nem képes ugyan teljesen megakadályozni a sejtpusztulás folyamatát, azonban a sejtsor denzitása nagyobb, a megmaradt sejtek ép morfológiát mutattak. Krezilibolya-festés alapján arra következtethetünk, hogy egyik vizsgált korcsoport esetén sem képes a KYNA és az SZR72 megakadályozni a sejtelhalás folyamatát, azonban késleltetheti annak bekövetkeztét. SZR104 nem volt képes modulálni egyik vizsgált csoport esetében sem az NMDA-indukálta excitotoxicitás mértékét, feltételezhetően az alacsony alkalmazott koncentrációja miatt.

4.1.4. KYNA és analógjai dózisfüggő hatásának vizsgálata

Korábbi vizsgálataink alapján elmondható, hogy a fiatal felnőtt (8-10 hetes) egerek agyszövetei nagy érzékenységet mutatnak az NMDA excitotoxikus hatásával szemben, ezért a további neuroaktív anyagok dózisfüggő hatását kizárólag e korcsoport esetén vizsgáltuk. A KYNA-t és analógjait (SZR72, SZR104) különböző koncentrációkban (20, 40, 100, 500 nM és 8 μ M) vizsgáltuk 10 μ M NMDA-indukálta excitotoxicitás modellben.

A KYNA KT rendszerünkben alacsony nanomólos (20 és 40 nM) koncentrációkban fejt ki neuroprotektív hatást. Magasabb nanomólos koncentrációk vagy nem fejtenek ki hatást (100 nM) az NMDA-kezelt csoporthoz képest, vagy a még magasabb dózisok (500 nM és 8 μ M) tovább fokozhatják az excitotoxicitás során felszabaduló LDH mennyiségét. Ezzel igazoltuk a szakirodalomban fellelhető állítást, miszerint a KYNA dózisfüggő kettős hatással rendelkezik.

Az SZR72 alkalmazott dózisától függetlenül képes volt protektív hatást kifejteni, minden vizsgált koncentrációban szignifikánsan lecsökkentette a felszabaduló LDH-mennyiségét NMDA-kezelt csoporthoz viszonyítva. Legintenzívebb protektív hatást 20 nM koncentrációban volt képes elérni.

Meglepő módon a legtöbb vizsgált koncentrációban az SZR104 hatástalannak bizonyult, nem okozott szignifikáns eltérést az NMDA-kezelt csoportokhoz képest az LDH-felszabadulás tekintetében. Ezzel szemben 100 és 500 nM koncentrációban az SZR104 jelentősen lecsökkentette a felszabaduló LDH-mennyiségét a felülűszóban.

4.2. NMDA-indukálta excitotoxicitás *in vivo* vizsgálata

Az *in vitro* kísérleteink alapján fiatal (2-4 hetes) és fiatal felnőtt (8-10 hetes) állatok esetében vizsgáltuk az i.p. adott NMDA potenciális károsító hatását hisztológiai módszerekkel. A *hippokampusz* CA1, CA3, CA4 piramis sejtrétegeit és GD granuláris sejtrétegeit vizsgáltuk kísérleteink során.

Krezilibolya-festés és NeuN-immunjelölés során sem detektáltuk a neuronális sejtpusztulás jeleit sem fiatal, sem pedig felnőtt állatcsoportok esetében. A *hippokampusz* minden sejtcsoportja intakt maradt 24 órával az NMDA i.p. beadását követően. A 75 mg/ttkg dózisú NMDA nem volt hatással az asztrocita állományra sem, a kezelés nem váltott ki gliózist. Bár szöveti szinten nem tapasztaltunk egyik korcsoport esetében sem változást a toxin hatására, fiziológiás sóoldattal oltott, kontroll egerekhez viszonyítva, magatartásbeli változások (fokozott motoros aktivitás, faroktő-sebzése) a kísérlet kezdeti szakaszában a fiatal korcsoport esetében jelentek meg.

5. Eredmények összefoglalása

Az eredményeink alapján a célkitűzések mentén megfogalmazott kérdéseinkre a következő válaszokat adhatjuk, és az alábbi következtetésekre juthatunk:

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 agyszövevei sokkal sérülékenyebbek bizonyultak, 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 SZR72-kezelés neuroprotektívnek bizonyult felnőtt állatok esetében. Ezzel szemben fiatal állatcsoportoknál nem voltak képesek befolyásolni a szöveti integritást. Az SZR104-es kezelés 40 nM-os koncentrációban hatástalannak bizonyult minden korcsoportnál.

3. A KYNA kémiaileg módosított analógjainak dózisfüggő hatásait kutatócsoportunk elsőként vizsgálta. KYNA a szakirodalomban fellelhető adatok alapján dózisfüggő kettős hatással rendelkezik: alacsony nanomólos dózisban protektív, magasabb nanomólos és mikromólos tartományban hatástalan vagy pedig toxikus hatású. **Eredményeink azt mutatják, hogy az SZR72 az általunk vizsgált dózisoktól függetlenül neuroprotektív hatást gyakorol az agyszövetekre. Az SZR104-es kezelés azonban a legtöbb koncentrációban hatástalannak bizonyult rendszerünkben, de a magasabb nanomólos koncentrációkban szignifikáns protektív hatást fejtett ki.**

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 az NMDA beadását követően.

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.

6. Summary

Kynurenic acid (KYNA) is a key neuroprotective substance of the kynurenine pathway. Its decreased level has been associated with several neurodegenerative diseases. KYNA supplementation may be therapeutic, but its poor blood-brain barrier (BBB) penetration limits clinical use. To address this, chemically modified KYNA analogues (e.g., SZR72, SZR104) have been synthesized, which show neuroprotective effects but penetrate the BBB better. Since excitotoxicity is a fundamental pathomechanism of many neurodegenerative diseases, the neuromodulatory effects of KYNA and its analogs were investigated in an N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity model.

In our *in vitro* studies, a small volume incubation system was used with acute brain slices from mice of different ages. Biochemical assays were performed on supernatants, and histological analyses were conducted on tissue samples. For *in vivo* experiments, animals received intraperitoneal NMDA or saline, followed by histological analysis of the hippocampus.

In vitro studies show that NMDA induces excitotoxicity even at low concentrations. Brain slices of young mice are more resistant to the damaging effects of NMDA, and KYNA, SZR72, and SZR104 treatment had no effect in this age group. In adults, NMDA induced a significant hippocampal damage. However, KYNA and SZR72 treatment proved to be neuroprotective, while SZR104 had no effect in any age group. KYNA exhibited dose-dependent dual effects in our system, SZR72 was neuroprotective at the concentrations tested. SZR104 was only protective at higher nanomolar concentrations. *In vivo*, we were unable to detect excitotoxicity in the hippocampus in either young or adult animals.

In summary, 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.

7. 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 értekezés 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

Nyilatkozat

Alulírott Dr. Kis Zsolt, mint a jelölt témavezetője igazolom, hogy Balog Emma doktorjelölt jelentős mértékben hozzájárult a fent említett tudományos publikációk elkészítéséhez. Az értekezésében megfogalmazott eredményeket más doktori értekezésben nem használjuk fel. Kijelentem, hogy a jelölt által végzett kísérletek eredményét saját magam és a további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

Szeged, 2025.07.02.



Dr. Kis Zsolt

egyetemi adjunktus