

# PhD tézis

## Az ösztradiol és új, nem-klasszikus ösztrogén-szerű jelátviteli aktivátorok hatásmechanizmusa és neuroprotektív potenciálja

**Farkas Szidónia**

PhD témavezetők:

Prof. Dr. Zelena Dóra

(Prof. Dr. Ábrahám István†)

PhD Programvezető: Prof. Dr. Reglődi Dóra



**Pécsi Tudományegyetem**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Élettani Intézet**

**Pécs**

**2023**

# **1. Bevezetés**

## **1.1. Ösztrogének**

A női nemi hormonokat, beleértve az ösztrogéneket, az 1930-as években fedezték fel és jellemezték. Az első áttörés óta közel 100 év telt el, de az ösztrogén iránti érdeklődés, amit a publikációk nagy száma is tükröz, még mindig magas.

Az emberben három fontos ösztrogén molekula található: az ösztron (E1), a  $17\beta$ -ösztradiol (E2) és az ösztriol (E3). Az E2 a petefészekben termelődő legaktívabb ösztrogén hormon. Annak ellenére, hogy az ösztrogének az emlősök szervezetében szinte az összes gén működését befolyásolják, leginkább a szaporodásban betöltött jelentős szerepükről ismertek. Befolyásolják a másodlagos női jellegek kialakulását, mediálják a szaporodást, a menstruációs ciklust, valamint a szexuális és az érzelmi viselkedést. Változókor alatt vagy a petefészkek műtéti eltávolítása után az E2 koncentrációja csökken, ami kellemetlen tüneteket, például hőhullámokat, érzelmi zavarokat, memóriavesztést és csonttrikulást eredményezhet (Nelson, 2008). Ezen felül az E2 elősegíti a csontok normális fejlődését, valamint védi a csontszerkezetet azáltal, hogy gátolja a lebontó oszteoklaszt aktivitást. Ezért pótlása pozitív hatást fejt ki az osteoporosisra mind ösztrogénhiányos, mind posztmenopauzás nőknél (Levin et al., 2018). A menopauza tüneteinek kezelése az ösztrogének egyik legelső terápiás alkalmazása volt. A későbbiekben azonban számos más betegség terápiájában merült fel alkalmazása.

## **1.2. Az E2 hatásmechanizmusa**

### **1.2.1. Klasszikus jelátviteli útvonal**

A klasszikus hatásmechanizmus szerint, mivel az E2 egy lipofil molekula, passzív diffúzióval átjut a membránon és a citoplazmában intracelluláris ösztrogén receptorokhoz (ER) kapcsolódik. A biológiailag aktív ligandum-receptor komplex bonyolult eseménysort indukál, amely a receptor konformációs változásaival kezdődik, majd a receptor dimerizációja követi, és az aktivált ligandum-receptor komplex sejtmagba történő közvetlen transzlokációjához vezet (Klinge, 2000). A dimerizált receptorkomplex kölcsönhatásba lép nukleáris receptor koaktivátorokkal, például a 160 kDa-os szteroid receptor koaktivátor fehérjével (SRC/P160) vagy a ciklikus adozin 3', 5'-monofoszfát (cAMP) válaszelem kötő fehérjével (CREB) (Le Dily & Beato, 2018). A teljes komplex ezután egy specifikus DNS-szekvenciához, az ösztrogén válasz elemhez (ERE) kötődik, hogy stimulálja a transzkripciót, végül új fehérjéket eredményezve (Ayaz et al., 2019). A citonukleáris ER-ek kulcsfontosságúak a klasszikus

útvonal aktiválásában. A klasszikus hatásmechanizmus önmagában azonban nem elegendő az ösztrogén hatások széles spektrumának teljes magyarázatához.

### **1.2.2. Nem-klasszikus jelátviteli útvonal**

Az E2 nem klasszikus mechanizmusát vagy a membránba kihelyezett ER-eken keresztül, vagy speciális G-protein kapcsolt ER-eken keresztül (GPER), esetleg ioncsatornákra gyakorolt közvetlen hatások révén fejti ki. A membránreceptorok aktiválása a protein kináz A (PKA), a foszfátidil-inozitol-3-OH kináz (PI3K) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonalakon keresztül történő intracelluláris jelátvitelt serkenti (Bryant et al., 2005). Ez ERE-független, közvetett géntranszkripcióhoz vezethet (McDevitt et al., 2008). A nem ERE-függő gének transzkripciójának elindítása mellett a nem klasszikus útvonal másik kulcsfontosságú jellemzője a válasz sebessége. Szego és Davis egy korai tanulmánya a cAMP-szint gyors növekedését mutatta ki a méhszövetben 15 másodperccel az E2 beadást követően (Szego & Davis, 1967). Ezenkívül az E2 másodpercek alatt aktiválja a MAPK útvonalat, a mitogén-aktivált extracelluláris szignál által regulált kináz (MEKK), a MAPK, és az extracelluláris szignál regulált kináz 1/2 (ERK1/2) foszforilációs kaszkádján keresztül (Chang et al., 2003). Létezik egy alternatív útvonal a PI3K jelátviteli molekulákon keresztül (pl: protein kináz B-n (AKT)), amely az ER-ek, valamint a GPER-en kifejtett hatással (Barabas et al., 2006) az endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) aktiválását eredményezi (Sirohi et al., 2022).

### **1.3. 17 $\beta$ -ösztradiol a neuroprotekciónban**

A demencia magasabb prevalenciája a posztmenopauzába lépett nőknél arra utal, hogy a női szexuális szteroidok, különösen az E2, megelőző hatásúak lehetnek. Valóban jelentős mennyiségű ER található az epizodikus és munkamemória központjaiban, a hippocampusban (HC) és a prefrontális kéregben (PFC), valamint a bazális előagyban (BE), így a perimenopauza során az E2 fluktuációja jelentős kognitív deficitet okozhat (Genazzani et al., 2007). A memóriaképződés mellett az E2 befolyásolja a neuroinflammációt is. Kutatások szerint az agy instabil E2-szintje összefügg a migrénhez vezető neurogén gyulladás kialakulásával (Karkhaneh et al., 2015).

#### **1.3.1. Az ösztrogén és a bazális előagyi kollinerg neuronok kapcsolata**

A kollinerg rendszer az egyik legfontosabb és legkiterjedtebb neurotranszmitter hálózat a központi idegrendszerben. A legtöbb kollinerg neuron a bazális előagyban (BE) található. A BE négy anatómiai régióból áll: a mediális septumból (MS), a Broca féle ventrális és diagonális kötegből (vDB és hDB), valamint a substantia innominata és nucleus basalis magnocellularis

komplexumból (SI/NBM; ezt a neuroanatómiai struktúrát az emberben Meynert nucleusnak nevezik) (Hampel et al., 2018). Az E2 befolyásolja a bazális előagyi kolinerg (BEK) neuronok morfológiáját, neurokémiai és elektrofiziológiai tulajdonságait. Ovariektómiát (OVX) követően az E2-kezelés növeli a kolinerg neuronok méretét, dendritek hosszát és elágazódási fokát a hDB-ben és az SI/NBM-ben (Ping et al., 2008). Gibbs kutatócsoportja azt is kimutatta, hogy az E2 alkalmazása növeli az acetilkolin (ACh) szintézist a BEK neuronokban azáltal, hogy növeli a kolin-acetiltranszferáz (ChAT) enzim expresszióját és aktivitását (Gibbs & Aggarwal, 1998). Patkányokon végzett *in vivo* kísérletek azt mutatták, hogy az SI/NBM-be injektált neurotoxikus NMDA vagy  $A\beta_{1-42}$ -t követően az E2 helyreállította a kolinerg rendszer szinaptikus integritását a kortexben (Kwakowsky et al., 2016). Bár az E2 neuroprotektív hatása a BEK neuronokra döntő fontosságú, a mechanizmus még mindig nem tisztázott. Ennek a hatásnak a hátterében a BEK neuronok ismert  $ER\alpha$  expressziója is állhat (Kalesnykas et al., 2005).

### **1.3.2. Az ösztrogén és az Alzheimer kór**

Az Alzheimer kór (AD) a demencia leggyakoribb típusa, amely a világ 10 vezető haláloka közé tartozik. A memória, a figyelem és az alvás zavarai jellemzik. A betegek mindennapi életük során gyakran viselkedési nehézségekkel, szorongással és kognitív zavarokkal küzdenek (Scheltens et al., 2016). Morfológiailag a kognitív és érzelmi funkciókban érintett agyterületeken - mint a hippokampusz (HC), kéreg (CTX) és amigdala – $A\beta$  plakkok és a pTau aggregátumok jelennek meg (Querfurth & LaFerla, 2010). Ezen morfológiai változások alapján az AD legelterjedtebb állatmodellje az  $A\beta$  agyba történő injekciója volt (akár intracerebroventrikulárisan, akár a HC-ba vagy egyéb területekre) (Facchinetti et al., 2018). Az  $A\beta$  nem megfelelő kiürülése és a modell bonyolultsága miatt a transzgénikus egérvonalak napjainkban népszerűbbé váltak.

Az AD három fő kockázati tényezője az életkor, a nem és a genetikai mutációk (Nebel et al., 2018). Köztudott, hogy a betegség incidenciája az életkor előrehaladtával növekszik, de fontos megjegyezni, hogy a páciensek 70%-át a nők teszik ki (Fisher et al., 2018). Az idősek körében a női prevalencia növekedésében fontosak lehetnek a változókor során bekövetkező hormonális változások (Pike, 2017). Valójában mind az E2, mind a progeszteron kulcsszerepet játszik a neuroprotektációban, ezáltal bevitelük javítja a kognitív funkciókat, a memóriát, a figyelmet, a szinaptikus plaszticitást, a dendritikus tüskék sűrűségét és a dendritképződést (Kwakowsky et al., 2016). Következésképpen a petefészekhormonok elvesztése befolyásolhatja ezeket a

funkciókat, és fokozhatja az amiloidogén markerek megjelenését, súlyosbítva az AD progresszióját.

#### **1.4. A hormonpótló kezelés nehézségei**

Manapság az E2-terápia alkalmazható hormonális fogamzásgátlásként, hormonpótló kezelésként a menopauza idején, vagy feminizáló hormonterápiaként transznemű nők nemi diszfóriájának kezelésére. Menopauza után a hormonpótló kezelésre (HPK) vonatkozó javallatok meredeken emelkedtek az 1980-as évek vége óta, azt állítva, hogy „a változókor hormonhiányos betegség, gyógyítható és teljesen megelőzhető, csak ösztrogént kell szedni” (Wilson, 1966), mivel számos epidemiológiai tanulmány kimutatta, hogy a HPK csökkenti a csontritkulás, a szívkoszorúér-betegség és a bármilyen okból bekövetkező halálozás kockázatát (Lobo et al., 2016). Az 1990-es évek végén végzett nagyszabású, kontrollált klinikai vizsgálatok azonban a HPK kedvező paradigmájának újraértékelését eredményezték. 1998-ban a „Szív és ösztrogén/progesztin helyettesítő vizsgálat (HERS)” kimutatta, hogy a hormonpótló kezelés nem csökkenti a kiújuló miokardiális infarktus kockázatát (Hulley et al., 1998). Ezt követően 2002-ben és 2004-ben a Woman Health Initiatives (WHI) klinikai tanulmányai kimutatták, hogy sem az E2-PG kombináció, sem az E2 önmagában nem csökkentette a szívkoszorúér-betegség kockázatát (Anderson et al., 2004; Shumaker et al., 2004). Sőt, a kombinált HPK még a stroke, a vénás thromboembolia és a mellrák kockázatát is növelte. Ezért a HPK sem a koszorúér-betegség, sem a csontritkulás megelőzésére már nem javasolt.

A HPK súlyos mellékhatásai más irányba terelték az ösztrogénkutatást. A közös cél az volt, hogy olyan új formulákat vagy molekulákat találjanak, amelyek nem rendelkeznek az ösztrogén káros mellékhatásaival, de pozitív hatással vannak a menopauza tüneteire, beleértve az idegrendszeri problémákat, az érrendszeri elváltozásokat és a csontritkulást.

#### **1.5. Új terápiás tehetőségek: a nem-klasszikus ösztrogén-szerű útvonalat aktiváló molekulák (ANGELS)**

Számos ösztrogén-szerű vegyület áll rendelkezésre széles terápiás indikációkkal, amelyek eltérően befolyásolják az ösztrogénhez kapcsolódó jelátviteli utakat: szelektív ösztrogén-receptor modulátorok (SERM-ek), fitoösztrogének, szelektív ösztrogén-receptor downregulátorok (SERD-ek), GPER1 agonisták/antagonisták vagy aromataz inhibitorok.

A nem-klasszikus ösztrogén-szerű jelátvitel (ANGELS) aktivátorai új megközelítést jelentenek az E2 terápiában (Manolagas et al., 2002). Három ilyen hatású molekula ismert: az ösztrén (4-esztren-3alfa, 17béta-diol), az A vegyület (2-(4-hidroxi-fenil)-3-metilbenzo[b]tiofén-5-ol) és a

B vegyület (3',15b-dihidrociklopropan [14,15]ösztro-1,3,5(10),8-tetraén-3,17alfa-diol), de terápiában még egyiket sem alkalmazzák (Kwakowsky et al., 2013). Az öszttréről kimutatták, hogy csontvédő hatással bír anélkül, hogy befolyásolná az endometrium proliferációját (Otto et al., 2008). Mitöbb, BEK neuronokra kifejtett neuroprotektív potenciálja is bizonyított egy A $\beta$  mikroinjekciót alkalmazó AD állatmodellben (Kwakowsky et al., 2016).

Terápiás potenciáljuk mellett az új HPK-ek és hasonló készítmények segítenek jobban megérteni az E2 részletes, fiziológias hatásait. Bár a neuroprotektív, antitrombotikus, oszteoprotektív és antikarcinogén hatású tökéletes terápia még felfedezésre vár, a felhalmozódó adatok talán közelebb vihetnek hozzá.

## 2. Célkitűzések

Doktori értekezésem fő célja volt új ANGELS molekulákat találni, melyek nem rendelkeznek klasszikus mellékhatásokkal, bizonyítottan nem-klasszikus jelátvitelt aktiválnak, valamint neuroprotektív potenciált mutatnak.

Kutatásunk kezdeti lépése a lehetséges molekulák *in silico* szelekciója volt, egy meglévő adatbázis felhasználásával, valamint együttműködve a Farmakológia és Farmakoterápia Intézetben dolgozó Dr. Hetényi Csabával és Dr. Jeszenői Norberttel.

Doktori munkám során a részletes célok a következők voltak:

1. Klasszikus hatásmechanizmus nélküli új ANGELS vegyületek azonosítása 15 leszintetizált molekulából.
  - 1.1. A molekulák E2-szerű ERE aktiváló potenciáljának *in vitro* kiszűrése MCF7 sejtekben luciferáz alapú vizsgálat segítségével (kísérlet 1).
  - 1.2. További *in vivo* E2-szerű uterotróp mellékhatással rendelkező molekulák kizárása (kísérlet 2).
2. *In vitro* igazolni, hogy a kiválasztott ANGELS molekulák nem klasszikus hatásmechanizmussal rendelkeznek, MCF7 sejteken, Western blot technikával. A következő downstream messenger molekulák foszforilációja került vizsgálatra: ERK1/2, AKT és CREB (kísérlet 3).

Ezen lépések alapján a legígéretesebb ANGELS molekulát (A3270) választottuk ki és használtuk fel a következő kísérletekben.

3. A kiválasztott ANGELS és az E2 *in vivo*, az SI/NBM-ra kifejtett neuroprotektív potenciáljának meghatározása az AD neurotoxikus modelljében, mind hím, mind nőtény egerekben, végpontjelzésként AChE és ChAT immunhisztokémiát alkalmazva (kísérlet 4).
4. Egyszeri E2 vagy ANGELS kezelés *in vivo* neuroprotektív hatásának meghatározása az AD genetikai egérmódeljében (3xTg-AD). Morfológiai (AChE, ChAT, A $\beta$  és pTau) és viselkedési (kényszerített úszás teszt, y-labirintus) paramétereket vizsgálva (kísérlet 5).
5. Annak vizsgálata, hogy az OVX befolyásolja-e a testösszetételt (testzsírszázalék, MRI) az AD-ra jellemző morfológiai (AChE, ChAT és A $\beta$ ) és viselkedésbeli (Y-labirintus, Morris féle vízi labirintus, róka szag teszt) elváltozásokat 3xTg-AD egérmódeljben. Valamint egy olyan állatmodell létrehozása, amely felgyorsítja az AD tüneteinek megjelenését (kísérlet 6).

### 3. Eredmények és megbeszélés

A disszertációban bemutatott kísérletekben 6 ANGELS vegyületet azonosítottunk *in vivo* és *in vitro* klasszikus hatások nélkül, valamint az alternatív E2 jelátviteli útvonalak *in vitro* aktiválásával. A kiválasztott, legjobb profillal rendelkező vegyület már egyetlen kezelés után neuroprotektív potenciált mutatott mind az AD neurotoxikus, mind transzgenikus modelljében, azonban az adott időpontban (24 órával a tesztelés előtt) nem volt képes megváltoztatni a viselkedést. Megerősítettük továbbá, hogy az OVX felgyorsíthatja a morfológiai elváltozások megjelenését a 3xTg-AD modellben, lehetővé téve a fiatalabb állatokon való kísérletezést, ezáltal lerövidítve a további gyógyszerfejlesztést.

#### 3.1. Klasszikus hatások vizsgálata (kísérlet 1,2)

Az E2 nagy affinitást mutat az ERE transzkripciós faktorhoz, és ez a kötés tudottan a legfontosabb lépés a klasszikus mechanizmusban (Koszegi & Cheong, 2022). Mivel a HPK-nek számos mellékhatása van, mint például a stroke, az emlőrák és a méhnyálkahártyarák megnövekedett kockázata, amelyek többnyire a klasszikus hatásukhoz köthetők, az új gyógyszerfejlesztés során elengedhetetlen a molekulák ezen hatásmechanizmusuk alapján történő kizárása. A megnövekedett ERE aktivitás és a mellékhatások jelenléte közötti összefüggés azonban még nem bizonyított. A bemutatott pozitív és szignifikáns korreláció az *in vitro* megnövekedett ERE aktivitás és az *in vivo* megnövekedett méhtömeg között, a két paraméter szoros kapcsolatát bizonyítja. Ezért

vizsgálatunk alkalmasnak tűnik molekulák előszelekciójára, illetve olyan vegyületek azonosítására, amelyek nem fejtenek ki klasszikus hatásmechanizmust.

Az *in silico* dokkolást követően, 15 molekulát szintetizáltattunk le és teszteltünk klasszikus mellékhatásprofilra. A teszteltek közül 6 ANGELS molekula nem mutatott ERE aktivitást *in vitro* és uterotróp mellékhatást *in vivo*. A 6 kiválasztott molekulával folytattuk kísérleteinket.

### **3.2. Nem-klasszikus hatásmechanizmus (kísérlet 3)**

Az E2 5 perces kezelést követően nem klasszikus hatásokat tudott kiváltani egy adenokarcinóma sejtvonalban (MCF-7), az AKT és az ERK1/2 fokozott foszforilációja révén. Az 5 perces intervallum azért kulcsfontosságú, mert a nem genomiális jelátvitelre is gyors hatásmechanizmus jellemző (Szego & Davis, 1967) Mivel a vizsgálni kívánt fehérjék foszforilációja 10 perc után csökkenni kezdett, az ANGELS vegyületeknél az 5 perces időablakot alkalmaztuk. Mind a 6 vizsgált ANGELS molekula az E2-vel azonos dózisban (szuprafiziológiás, terápiás dózis) növelte az ERK1/2 és az AKT foszforilációját. A CREB fehérje aktiválódása csak az A3270 beadása után volt megfigyelhető. A három vizsgált fehérje másodlagos hírvivőként kulcsszerepet játszik a MAPK-PKA-CREB útvonalban, és korábban kimutatták, hogy az E2 aktiválja őket különböző szövetekben, többek között az agyban. Például a HC-CA1 régiójában a globális ischaemia elősegítette az ERK1/2 és CREB korai defoszforilációját és inaktivációját, amit az E2-kezelés megakadályozott (Jover-Mengual et al., 2007). A dentate gyrusban a molekulák foszforilációs státusza nemi különbséget mutatott. Intakt nőstény rágcásolóknál magasabbak voltak az AKT útvonal foszforoproteinjei, mint a hímeknél. Az OVX-es állatok E2-kezelés után a MAPK és az AKT útvonalhoz kapcsolódó foszforoproteinek (pERK1/2, pJNK, pAKT és pGSK-3 $\beta$ ) növekedését mutatták (Sheppard et al., 2022). A MAPK útvonal E2 általi aktiválása a kolinerg neuritok növekedésével is összefügg (Dominguez et al., 2004), valamint a BEK neuronok E2-mediált szabályozása ERK1/2 aktivitást is igényel (Pongrac et al., 2004). Szego és mtsai. kimutatták, hogy az E2 kezelés közvetlen, nem klasszikus hatást fejt ki a BEK neuronokban, és aktiválja a PKA és MAPK útvonalakat az ER-en keresztül, ami a CREB foszforilációjához vezet az SI/NBM-ben *in vivo* (Szego et al., 2006). Később ugyanez a kutatócsoport publikálta, hogy az E2 kolinerg rostokra kifejtett helyreállító hatásait blokkolja a MEK1/2 gátlása a MAPK útvonalon (Koszegi et al., 2011).

### **3.3. Neuroprotekción egy neurotoxikus AD állatmodellben (kísérlet 4)**

Az A $\beta$ <sub>1-42</sub> intrakraniális mikroinjekciója egy széleskörűen alkalmazott technika a sporadikus AD modellezésére (Nichols et al., 2020). Korábbi tanulmányok az Ábrahám laborból



kimutatták, hogy egy NMDA mikroinjekció a SI/NBM területére léziót okoz helyileg, csökkentve a kolinerg neuronok számát és azok projekcióját az ipsilaterális SSC-be (Kozegi et al., 2011). Egy egyszeri E2 kezelés nem befolyásolta a ChAT pozitív neuron pusztulást az ellenoldali kontroll agyterülethez képest, azonban megnövelte a kolinerg rostok denzitását a SSC-ben. Ezeket a megállapításokat később kiegészítették egy  $A\beta_{1-42}$  injekciós modellel, ahol az E2 ugyanazt a hatást fejtette ki. Ráadásul nemcsak az E2, hanem más, nem klasszikus E2 útvonal aktivátorok, mint például az ösztren is helyreállították a kolinerg kortikális projekciók elvesztését, és mérsékeltek az  $A\beta_{1-42}$  által kiváltott tanulási nehézségeket (Kwakowsky et al., 2016). Ugyanazon  $A\beta_{1-42}$  injekciós modell segítségével megerősítettük, hogy a kiválasztott ANGELS (A3270) hasonló hatással bír, mint az E2 és ösztren. A hatás nem korlátozódott a nőstényekre, hím állatokban is kimutatható volt, ami az E2, valamint az ANGELS-ek általánosabb, nemtől független neuroprotektív szerepére utal. Mivel azonban nem volt különbség a nemek között, további kísérleteinkben csak a nőstényekre koncentráltunk.

Az általunk alkalmazott terápia inkább megelőzés, mint kezelés volt, mivel a neurotoxikus beavatkozás után 1 órával alkalmaztuk. Ezenkívül az  $A\beta_{1-42}$  neurotoxicitási AD modellnek vannak korlátai, például nem modellezi a teljes patomechanizmust, sebészeti beavatkozást igényel, és nem veszi figyelembe a genetikai hajlamokat. Ezért a terápiás potenciál megerősítésére és kiegészítésére egy másik modellt is alkalmaztunk. Kutatásunk a két (neurotoxikus és genetikai) AD modell előnyeiből profitált (Götz & Ittner, 2008).

### **3.4. Neuroprotekción egy genetikai AD modellben (kísérlet 5)**

Kísérleteinkhez a háromszoros transzgén (3xTg-AD) állatmodellt választottuk, mivel előállítása óta széleskörűen alkalmazott és karakterizált (Oddo et al., 2003). Mindazonáltal az AD a nőknél gyakoribb, ezért erre a nemre koncentráltunk. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy az OVX a 3xTg-AD egerekben növelte az  $A\beta$  felhalmozódást és rontotta a memóriát, míg az E2, de nem a PG, megakadályozta ezeket a hatásokat (Carroll et al., 2007). Mi 48 órával az akut E2 vagy ANGELS kezelés után nem észleltünk változást az  $A\beta$  plakkok számában a motoros kéregben (MC), SSC-ben, a basolaterális amigdalában (BLA) és a HC dorsal-subiculum régiójában (dSub- HC), illetve nem változott a pTau aggregátumok mennyisége sem a BLA-ban, HC-CA3-régióban vagy az amigdalopiriform kéreg átmeneti területén (APir). Az elváltozások hiányát magyarázhatja az egyszeri dózis vagy a kezelés és a perfúzió között eltelt rövid időtartam. A korábban említett vizsgálatok krónikus E2 kezelést alkalmaztak - például beültetett 90 napos 0,25 mg E2-t tartalmazó szubkután pelletet (Carroll et al., 2007) - az  $A\beta$  plakkok vizsgálatára. Annak ellenére, hogy vegyületeink nem

befolyásolták a plakkok számát, mind az E2, mind az ANGELS vegyületünk - egyszeri adagolás után is - helyreállította a kolinerg rostok elvesztését az SSC-ben anélkül, hogy az SI/NBM régió sejtszámát megváltoztatta volna.

Mivel viszonylag fiatal (5-6 hónapos) állatokat használtunk; ezért nem meglepő, hogy a rövid távú memória hiánya nem volt kimutatható az y-labirintuson, még 2 hét OVX után sem, lévén, hogy a kognitív tünetek később jelentkeznek (Várkonyi et al., 2022). Korábbi vizsgálataink azonban ismételen csökkent mozgékonytságot mutattak ki modellünkben (Szabó et al., 2023; Várkonyi et al., 2022), így az ANGELS által kiváltott mozgás fokozódás megelőző szerepre utalhat. Az E2 bizonyítottan befolyásolja az érzelmi viselkedést, korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a beadás után 24-48 órával képes az erőltetett úszás tesztben a depresszió-szerű viselkedést visszafordítani (Estrada-Camarena et al., 2002). Ezzel összhangban az E2 kezelésünk növelte a küzdelmet, az aktív menekülési mozgást az FST-ben. Az ANGELS vegyületünknek azonban nem volt ilyen hatása. Mivel a használt molekulát kifejezetten a nem klasszikus, gyors hatás miatt választottuk ki, feltételezhetjük, hogy a vizsgált időpontot nem választottuk meg optimálisan. Valójában egyes tanulmányok az E2 hatékonyságát már 30 perc után is kimutatták (Rocha et al., 2005). Korábbi morfológiai eredményeink azonban tartós hatást támasztottak alá, ezért volt mégis releváns az alkalmazott időintervallum.

Összességében a kiválasztott ANGELS molekulák neuroprotektív potenciállal rendelkeztek transzgenikus állatmodellben is. A modell azonban finomításra szorul, mivel az idős állatokra vonatkozó igény az AD kísérletekhez nem tette lehetővé a nagy számú állaton történő vizsgálatokat.

### **3.5. A hormondepléció hatása az AD pathomechanizmusára (kísérlet 6)**

Fiatal, 4 hónapos egerekben az 1 hónapos OVX fokozott neurodegenerációt okozott (magnövelte az amiloid lerakódásokat a BLA-ban és csökkentette kolinerg rostsűrűséget az SSC-ben), míg nem súlyosbította az AD-ra jellemző kognitív és szorongásos tüneteket.

Megerősítettük, hogy OVX modellünk megfelelő volt, mivel megnövekedett testtömeget, testzsír százalékot, és lecsökkent uterusz tömeget és uterusz falvastagságot észleltünk az OVX állatokon. A szexuálszteroidok hiánya növelheti az elhízás kockázatát, mivel az E2 és a PG a glükóz és lipid anyagcsere közvetítésében is szerepet játszik, valamint befolyásolja az adipociták fiziológiáját (Mauvais-Jarvis, 2011). Az elhízás fontos rizikófaktor az AD patológiájában, hiszen növeli az A $\beta$  plakkok számát, az adipokininek, citokinnek mennyiségét és befolyásolja az inzulin homeosztázist (Picone et al., 2020). Az MRI vizsgálatok során

láthattuk, hogy a támasztószövetek aránya is csökkent. Ezt értelmezhetjük az oszteoporózis korai jeleként, mivel a menopauza utáni hormon csökkenés szorosan összefügg az alacsony csontsűrűség kialakulásával (Farkas et al., 2022).

A szakirodalom szerint a 3xTg-AD állatokban 6 hónapos korukra alakul ki memória deficit (Belfiore et al., 2019). Mivel a kísérletünkben felhasznált állatok 4-5 hónaposok voltak, az álműtött állatokban tapasztalt viselkedésvizsgálati eredményeink nem váratlanok. Hipotézisünket azonban nem tudtuk alátámasztani, mivel az OVX nem súlyosbította a kognitív hanyatlást vagy az érzelmi zavarokat. Az ép memória az A $\beta$  lerakódások alacsony számával is magyarázható a HC-ban és a SSC-ben (Jameie et al., 2021).

A szorongás a postmenopauzába lépett nők egyik jellemző tünete (Siegel & Mathews, 2015), valamint az AD-val is összefüggésbe hozható (Botto et al., 2022). A „Fox odor” (rókaszag) tesztben egyedül csak az AD hatása volt megfigyelhető (Bruzik et al., 2021), a 3xTg-AD állatok több időt töltöttek mozdulatlanságban és kevesebb időt töltöttek felfedezéssel és ágaskodással, ami arra utal, hogy jobban szorongtak, mint a többi állat (Adhikari et al., 2015; Bruzik et al., 2021). Ezek az eredmények összefügghetnek BLA területén megfigyelt A $\beta$  felhalmozódással. Ez az agyi terület felelős a félelemmel kapcsolatos érzelmi válaszok kialakításáért (Adhikari et al., 2015).

A finom viselkedésbeli változások ellenére a morfológiai különbségek egyértelműbbek voltak. Az OVX képes volt növelni az amiloid plakkok számát a 3xTg-AD állatokban BLA-ban azonban nem észleltünk változást a HC-ben és a SSC-ben. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy jóval idősebb állatokban az OVX indukált A $\beta$  képződést ezeken a területek is (Palm et al., 2014). Ez összhangban van humán vizsgálatokkal is, ahol az OVX-betegeket HPK-el kezelték, ami megakadályozta az A $\beta$  lerakódását (Zeydan et al., 2019). Emellett esetünkben az OVX tovább súlyosbította az AChE pozitív rostvesztését a 3xTg-AD állatok SSC-ben.

Mindazonáltal az OVX révén kiváltott morfológiai jegyek gyorsulása alkalmassá teszi ezt a beavatkozást, hogy fiatalabb 3xTg-AD egereken tudjunk vizsgálatokat végezni.

#### **4. Következtetések**

Az *in silico* szűrés lehetőséget adott olyan molekulák előválogatására, amelyek kötődnek az ER-ekhez, és nem klasszikus neuroprotektív potenciállal rendelkezhetnek. Megerősítettük, hogy az *in vitro* ERE aktivitásmérés hatékonyan képes azonosítani a klasszikus E2-szerű hatással rendelkező molekulákat. Valamint az ERE aktivitás szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az *in vivo* vizsgáltnál észlelt uterotróp mellékhatásokkal. Ezen hatások alapján sikerült

a kezdeti 15 molekulaszámot 6-ra csökkenteni. További *in vitro* tesztek igazolták ezen molekulák nem klasszikus hatásmechanizmusát, mivel aktiválták a MAPK-PKA útvonalban szerepet játszó fehérjéket, MCF-7 sejtekben, 5 perc kezelést követően. A kezdeti 15-ből egy ANGELS molekulát (kódnév: A3270) választottunk ki, amely nem mutatott megnövekedett ERE-aktivitást, uterotróp mellékhatást, és nemcsak az AKT-t és az ERK1/2-t, hanem a CREB fehérjéket is képes volt aktiválni. A kiválasztott ANGELS molekula neuroprotektív potenciált mutatott az AD neurotoxikus és transzgenikus modelljében egyaránt. Mind az E2, mind az ANGELS növelte a kolinerg neuronok rostsűrűségét a SSC-ben, de nem tudták helyreállítani a kolinerg neuronok pusztulását a BE-ban. Az egyszeri injekció nem volt hatással a 24 órával később vizsgált viselkedésre.

Végül a további kutatások elősegítése érdekében megerősítettük, hogy az OVX által kiváltott menopauzális tünetek 3xTg-AD egerekben is súlyosbították az AD-vel összefüggő morfológiai elváltozásokat az agyban anélkül, hogy befolyásolták volna a viselkedést. Így a fiatal, 3 hónapos 3xTg-AD egerekben végrehajtott OVX megfelelő modell lehet az új kezelések strukturális szintű tesztelésére, ami felgyorsíthatja új vegyületek kipróbálását (nem kell 6-12 hónapot várni az állatok öregedésére).

## 5. Publikációs jegyzék

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

**Farkas S**, Szabó A, Hegyi AE, Török B, Fazekas CL, Ernszt D, Kovács T, Zelena D. (2022). *Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions*, *Biomedicines*, 6;10(4):861. (IF= 4.75)

**Farkas S**, Szabó A, Török B, Sólyomvári C, Fazekas CL, Bánrévi K, Correia P, Chaves T, Zelena D. (2022). *Ovariectomy-induced hormone deprivation aggravates A $\beta$ 1-42 deposition in the basolateral amygdala and cholinergic fiber loss in the cortex but not cognitive behavioral symptoms in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11; 13:985424. (IF= 6.05)

**Farkas S**, Jeszenői N, Kövesdi E, Horváth I, Szabó A, Zelena D, Kovács T, Hetényi C, Ábrahám I (2023). *New estrogen-like compounds show selective non-classical mechanism of action in MCF-7 cells and neuroprotective potential in two mouse models of Alzheimer's disorder*. – folyamatban

Egyéb tudományos közlemények:

Gáll Z, **Farkas S**, Albert Á, Ferencz E, Vancea S, Urkon M, Kolcsár M. (2020). *Effects of Chronic Cannabidiol Treatment in the Rat Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression*. *Biomolecules*. 22;10(5):801. (IF= 4.57)

Várkonyi D, Török B, Sipos E, Fazekas CL, Bánrévi K, Correia P, Chaves T, **Farkas S**, Szabó A, Martínez-Bellver S, Hangya B, Zelena D. (2022). *Investigation of Anxiety- and Depressive-like Symptoms in 4- and 8-Month-Old Male Triple Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease*. *Int J Mol Sci*. 2022 16;23(18):10816. (IF= 6.20)

Szabó A, **Farkas S**, Fazekas C, Correia P, Chaves T, Sipos E, Makkai B, Török B, Zelena D. (2023) *Temporal Appearance of Enhanced Innate Anxiety in Alzheimer Model Mice*. *Biomedicines*. 18;11(2):262. (IF= 4.75)

Kövesdi E, Udvarácz I, Kecskés A, Szócs S, **Farkas S**, Faludi P, Jánosi TZ, Ábrahám IM, Kovács G. (2023). *17 $\beta$ -estradiol does not have a direct effect on the function of striatal cholinergic interneurons in adult mice in vitro*. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4;13:993552. (IF= 6.05)

Összesített impakt faktor: 32.37

## 6. Elsőszerzős konferencia szereplések

**Farkas S**, Szabó A, Török B, Fazekas CL, Bánrévi K, Correia P, Chaves T, Ábrahám IM, Kovács T and Zelena D: *Chronic treatment with estrogen-like compounds shows anxiolytic and neuroprotective potential in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disorder*, FENS regional meeting 2023 (FRM2023), Poszter, Portugália, Algarve, 2023.05.3-5.

**Farkas S**, Szabó A, Kövesdi E, Faludi P, Ábrahám IM, Kovács T and Zelena D: *New estrogen-like non-classical mechanism activators show neuroprotective properties in two mouse models of Alzheimer's disorder*, European Neuroscience Conference by Doctoral Students (ENCODS), Poszter, Portugália, Faro, 2023.05.1-2.

**Farkas S**, Szabó A, Kövesdi E, Faludi P, Ábrahám IM, Kovács T and Zelena D: *Estrogen-like compounds show selective non-classical mechanism of action in MCF-7 cells and neuroprotective potential in two mouse models of Alzheimer's disorder*, IV. Idegtudományi

Társaság PhD and TDK konferencia, Előadás, Első helyezet, Magyarország, Pécs, 2023.03.31-04.01.

**Farkas S**, Szabó A, Jasper V, Nyers-Marosi K, Petrovai B, Ábrahám IM, Kovács T and Zelena D: *Quadruple-transgenic mice model of Alzheimer's disorder, with A $\beta$ 1-42 and pTau deposition, and cholinergic neuron specific Cre expression*, International Neuroscience Meeting- IBRO, ANA Workshop, Poszter, Magyarország, Budapest 2023.02.01-03.

**Farkas S**, Szabó A, Jasper V, Nyers-Marosi K, Petrovai B, Ábrahám IM, Kovács T and Zelena D: *Quadruple-transgenic mice model of Alzheimer's disorder, with A $\beta$ 1-42 and pTau deposition, and cholinergic neuron specific Cre expression*, 6th Hungarian Neuroscience Doctoral Conference for Undergraduate Students, Graduate Students and Junior Postdocs, Poszter, Magyarország, Budapest, 2023.01.31.

**Farkas S**, Szabó A, Kovács T, Ábrahám IM and Zelena D: *Acute treatment with an estrogen-like compound shows neuroprotective potential and changes the behavior of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disorder*, XI. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (IDK), Előadás, Magyarország, Pécs, 2022.11. 25-26.

**Farkas S**, Szabó A, Török B, Fazekas CL, Bánrévi K, Correia P, Chaves T, Zelena D: *Effect of gonadectomy-induced hormone deprivation on the progress of Alzheimer's disorder in 3xTg-AD mice*, The International Congress of Neuroendocrinology, ICN2022, Poszter, Egyesült Királyság, Skócia, Glasgow, 2022.08.7-10.

**Farkas S**, Szabó A, Kovács T, Ábrahám IM and Zelena D: *17 $\beta$ -estradiol and estrogen-like compound shows neuroprotective potential in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disorder*, FENS Forum 2022, Poszter, Franciaország, Paris, 2022. 07.09-13.

**Farkas S**, Szabó A, Kövesdi E, Faludi P, Ábrahám IM, Kovács T and Zelena D: *New estrogen-like compounds with neuroprotective potential in an A $\beta$ 1-42-induced neurotoxicity model of Alzheimer's disorder*, School of Neuroscience, Előadás, Olaszország, Lake Como, 2022.05.13.

**Farkas S**, Szabó A, Török B, Fazekas CL, Bánrévi K, Correia P, Chaves T, Zelena D: *Investigating the effect of female hormone depletion on the progression of Alzheimer's disease*, International Neuroscience Meeting - IBRO Workshop, Poszter, Magyarország, Budapest, 2022. 01. 27-28.

**Farkas S**, Szabó A, Török B, Fazekas CL, Bánrévi K, Correia P, Chaves T, Zelena D: *Investigating the effect of female hormone depletion on the progression of Alzheimer's disease*,

5th Hungarian Neuroscience Meeting for Undergraduate Students, Graduate Students and Junior Postdocs (HUNDOC), Poszter, Magyarország, Budapest, 2022. 01. 26.

**Farkas S**, Kövesdi E, Faludi P, Zelena D, Kovács T, Ábrahám IM: *New estrogen-like compounds discovered with neuroprotective potential in an A $\beta$ 1-42 -induced neurotoxicity*, X. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (IDK), Előadás, Magyarország, Pécs, 2021. 11. 12-13.

**Farkas S**, Kövesdi E, Faludi P, Jeszenői N, Hetényi C, Zelena D, Kovács T, Ábrahám IM: *Neuroprotective effect of estrogen-like ANGELS compounds*, 11th International symposium on cell/tissue injury and cytoprotection/neuroprotection ISTICHO-HUPHAR, Poszter, Magyarország, Pécs, 2021. 10. 27-30.

**Farkas S**, Kövesdi E, Faludi P, Jeszenői N, Hetényi C, Zelena D, Kovács T, Ábrahám IM: *New ANGELS compounds discovered with neuroprotective potential in an animal model of Alzheimer's disease*, Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MEDPÉCS20), Poszter, Magyarország, Pécs, 2020. 10. 16-17.

## 7. References

- Adhikari, A., Lerner, T. N., Finkelstein, J., Pak, S., Jennings, J. H., Davidson, T. J., Ferenczi, E., Gunaydin, L. A., Mirzabekov, J. J., Ye, L., Kim, S. Y., Lei, A., & Deisseroth, K. (2015). Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature*, 527(7577), 179–185.
- Anderson, G. L., Limacher, M., Assaf, A. R., Bassford, T., Beresford, S. A., Black, H., Bonds, D., Brunner, R., Brzyski, R., Caan, B., Chlebowski, R., Curb, D., Gass, M., Hays, J., Heiss, G., Hendrix, S., Howard, B. V., Hsia, J., Hubbell, A., ... Wassertheil-Smoller, S. (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 291(14), 1701–1712.
- Ayaz, G., Yasar, P., Olgun, C. E., Karakaya, B., Kars, G., Razizadeh, N., Yavuz, K., Turan, G., & Muyan, M. (2019). Dynamic transcriptional events mediated by estrogen receptor alpha. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 24, 245–276.
- Barabas, K., Szego, E. M., Kaszas, A., Nagy, G. M., Juhasz, G. D., & Abraham, I. M. (2006). Sex differences in oestrogen-induced p44/42 MAPK phosphorylation in the mouse brain in vivo. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(8), 621–628.
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, 18(1), e12873.
- Botto, R., Callai, N., Cermelli, A., Causarano, L., & Rainero, I. (2022). Anxiety and depression in Alzheimer's disease: a systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. *Neurological Sciences*, 43(7).
- Bruzsik, B., Biro, L., Sarosdi, K. R., Zelena, D., Sipos, E., Szebik, H., Török, B., Mikics, E., & Toth, M. (2021). Neurochemically distinct populations of the bed nucleus of stria terminalis modulate innate fear response to weak threat evoked by predator odor stimuli. *Neurobiology of Stress*, 15, 100415.

- Bryant, D. N., Bosch, M. A., Ronnekleiv, O. K., & Dorsa, D. M. (2005). 17-Beta estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. *Neuroscience*, *133*(1), 343–352.
- Carroll, J. C., Rosario, E. R., Chang, L., Stanczyk, F. Z., Oddo, S., LaFerla, F. M., & Pike, C. J. (2007). Progesterone and Estrogen Regulate Alzheimer-Like Neuropathology in Female 3xTg-AD Mice. *The Journal of Neuroscience*, *27*(48), 13357.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A., & McCubrey, J. A. (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, *17*(7), 1263–1293.
- Dominguez, R., Jalali, C., & De Lacalle, S. (2004). Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(4), 982–990.
- Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., & López-Rubalcava, C. (2002). Antidepressant-Like Effect of Different Estrogenic Compounds in the Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology* *2003* *28*:5, *28*(5), 830–838.
- Facchinetti, R., Bronzuoli, M. R., & Scuderi, C. (2018). An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid  $\beta$ -Peptide (1-42). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1727*, 343–352.
- Farkas, S., Szabó, A., Hegyi, A. E., Török, B., Fazekas, C. L., Ernst, D., Kovács, T., & Zelena, D. (2022). Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions. *Biomedicines*, *10*(4).
- Fisher, D. W., Bennett, D. A., & Dong, H. (2018). Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *70*, 308–324.
- Genazzani, A. R., Pluchino, N., Luisi, S., & Luisi, M. (2007). Estrogen, cognition and female ageing. *Human Reproduction Update*, *13*(2), 175–187.
- Gibbs, R. B., & Aggarwal, P. (1998). Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: Implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline. *Hormones and Behavior*, *34*(2), 98–111.
- Götz, J., & Ittner, L. M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews. Neuroscience*, *9*(7), 532–544.
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavado, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, *141*(7), 1917–1933.
- Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., & Vittinghoff, E. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, *280*(7), 605–613.
- Jover-Mengual, T., Zukin, R. S., & Etgen, A. M. (2007). MAPK Signaling Is Critical to Estradiol Protection of CA1 Neurons in Global Ischemia. *Endocrinology*, *148*(3), 1131–1143.
- Kalesnykas, G., Roschier, U., Puoliväli, J., Wang, J., & Miettinen, R. (2005). The effect of aging on the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the cholinergic neurons of transgenic and wild-type mice. *The European Journal of Neuroscience*, *21*(5), 1437–1442.
- Karkhaneh, A., Ansari, M., Emamgholipour, S., & Rafiee, M. H. (2015). The effect of 17 $\beta$ -estradiol on gene expression of calcitonin gene-related peptide and some pro-inflammatory mediators in peripheral blood mononuclear cells from patients with pure menstrual migraine. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *18*(9), 894–901.



- Klinge, C. M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*, 65(5), 227–251.
- Koszegi, Z., & Cheong, R. Y. (2022). Targeting the non-classical estrogen pathway in neurodegenerative diseases and brain injury disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 13.
- Koszegi, Z., Szego, É. M., Cheong, R. Y., Tolod-Kemp, E., & Ábrahám, I. M. (2011). Postlesion estradiol treatment increases cortical cholinergic innervations via estrogen receptor- $\alpha$  dependent nonclassical estrogen signaling in vivo. *Endocrinology*, 152(9), 3471–3482.
- Kwakowsky, A., Koszegi, Z., Cheong, R. Y., & Abraham, I. M. (2013). Neuroprotective effects of non-classical estrogen-like signaling activators: from mechanism to potential implications. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12(8), 1219–1225.
- Kwakowsky, A., Potapov, K., Kim, S., Peppercorn, K., Tate, W. P., & Abraham, I. M. (2016). Treatment of beta amyloid 1-42 (A $\beta$ (1-42))-induced basal forebrain cholinergic damage by a non-classical estrogen signaling activator in vivo. *Scientific Reports*, 6, 21101.
- Le Dily, F., & Beato, M. (2018). Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2).
- Levin, V. A., Jiang, X., & Kagan, R. (2018). Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos Int*, 29(5), 1049–1055.
- Lobo, R. A., Pickar, J. H., Stevenson, J. C., Mack, W. J., & Hodis, H. N. (2016). Back to the future: Hormone replacement therapy as part of a prevention strategy for women at the onset of menopause. *Atherosclerosis*, 254, 282–290.
- Manolagas, S. C., Kousteni, S., & Jilka, R. L. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 385–409.
- Mauvais-Jarvis, F. (2011). Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 22(1), 24–33.
- McDevitt, M. A., Glidewell-Kenney, C., Jimenez, M. A., Ahearn, P. C., Weiss, J., Jameson, J. L., & Levine, J. E. (2008). New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 24–30.
- Nebel, R. A., Aggarwal, N. T., Barnes, L. L., Gallagher, A., Goldstein, J. M., Kantarci, K., Mallampalli, M. P., Mormino, E. C., Scott, L., Yu, W. H., Maki, P. M., & Mielke, M. M. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(9), 1171–1183.
- Nelson, H. D. (2008). Menopause. *Lancet (London, England)*, 371(9614), 760–770.
- Nichols, R. A., Peña-Ortega, F., Haapasalo, A., Kwakowsky, A., Guzmán, C.-F. B., Rlm, F., Calvo-Flores Guzmán, B., Elizabeth Chaffey, T., Hansika Palpagama, T., Waters, S., Boix, J., Perry Tate, W., Peppercorn, K., Dragunow, M., John Waldvogel, H., & Lewis Maxwell Faull, R. (2020). The Interplay Between Beta-Amyloid 1-42 (A $\beta$  1-42)-Induced Hippocampal Inflammatory Response, p-tau, Vascular Pathology, and Their Synergistic Contributions to Neuronal Death and Behavioral Deficits. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(13), 522073.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421.
- Otto, C., Fuchs, I., Altmann, H., Klewer, M., Schwarz, G., Bohlmann, R., Nguyen, D., Zorn, L., Vonk, R., Prella, K., Österman, T., Malmström, C., & Fritzemeier, K.-H. (2008). In vivo characterization of estrogen receptor modulators with reduced genomic versus nongenomic activity in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 111(1), 95–100.

- Palm, R., Chang, J., Blair, J., Garcia-Mesa, Y., Lee, H. G., Castellani, R. J., Smith, M. A., Zhu, X., & Casadesus, G. (2014). Down-regulation of serum gonadotropins but not estrogen replacement improves cognition in aged-ovariectomized 3xTg AD female mice. *Journal of Neurochemistry*, *130*(1), 115.
- Picone, P., Di Carlo, M., & Nuzzo, D. (2020). Obesity and Alzheimer's disease: Molecular bases. *The European Journal of Neuroscience*, *52*(8), 3944–3950.
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 671–680.
- Ping, S. E., Trieu, J., Wlodek, M. E., & Barrett, G. L. (2008). Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(7), 1588–1598.
- Pongrac, J. L., Gibbs, R. B., & Defranco, D. B. (2004). Estrogen-mediated regulation of cholinergic expression in basal forebrain neurons requires extracellular-signal-regulated kinase activity. *Neuroscience*, *124*(4), 809–816.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, *362*(4), 329–344.
- Rocha Rebecca Fleischer James M Schaeffer Susan P Rohrer Gerry J Hickey, B. A. (2005). 7 $\beta$ -Estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor- $\beta$  knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology*, *179*, 637–643.
- SB, J., A, P., A, N., MS, J., M, F., JF, B., & L, E. (2021).  $\beta$ -Amyloid Formation, Memory, and Learning Decline Following Long-term Ovariectomy and Its Inhibition by Systemic Administration of Apigenin and  $\beta$ -Estradiol. *Basic and Clinical Neuroscience*, *12*(3).
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, *388*(10043), 505–517.
- Sheppard, P. A. S., Puri, T. A., & Galea, L. A. M. (2022). Sex Differences and Estradiol Effects in MAPK and Akt Cell Signaling across Subregions of the Hippocampus. *Neuroendocrinology*, *112*(7), 621–635.
- Shumaker, S. A., Legault, C., Kuller, L., Rapp, S. R., Thal, L., Lane, D. S., Fillit, H., Stefanick, M. L., Hendrix, S. L., Lewis, C. E., Masaki, K., & Coker, L. H. (2004). Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA*, *291*(24), 2947–2958.
- Siegel, A. M., & Mathews, S. B. (2015). Diagnosis and Treatment of Anxiety in the Aging Woman. *Current Psychiatry Reports*, *17*(12).
- Sirohi, V. K., Medrano, T. I., Mesa, A. M., Kannan, A., Bagchi, I. C., & Cooke, P. S. (2022). Regulation of AKT Signaling in Mouse Uterus. *Endocrinology*, *163*(1).
- Szabó, A., Farkas, S., Fazekas, C., Correia, P., Chaves, T., Sipos, E., Makkai, B., Török, B., & Zelena, D. (2023). Temporal Appearance of Enhanced Innate Anxiety in Alzheimer Model Mice. *Biomedicine*, *11*(2).
- Szego, C. M., & Davis, J. S. (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *58*(4), 1711–1718.
- Szegoo, É. M., Barabás, K., Balog, J., Szilágyi, N., Korach, K. S., Juhász, G., & Ábrahám, I. M. (2006). Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *The Journal of Neuroscience*, *26*(15), 4104–4110.
- Várkonyi, D., Török, B., Sipos, E., Fazekas, C. L., Bánrévi, K., Correia, P., Chaves, T., Farkas, S., Szabó, A., Martínez-Bellver, S., Hangya, B., & Zelena, D. (2022). Investigation of Anxiety- and Depressive-like Symptoms in 4- and 8-Month-Old Male Triple Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18).
- Wilson, R. A. (1966). *Feminine forever*. J.B. Lippincott Co.

Zeydan, B., Tosakulwong, N., Schwarz, C. G., Senjem, M. L., Gunter, J. L., Reid, R. I., Gazzuola Rocca, L., Lesnick, T. G., Smith, C. Y., Bailey, K. R., Lowe, V. J., Roberts, R. O., Jack, C. R., Petersen, R. C., Miller, V. M., Mielke, M. M., Rocca, W. A., & Kantarci, K. (2019). Association of Bilateral Salpingo-Oophorectomy Before Menopause Onset With Medial Temporal Lobe Neurodegeneration. *JAMA Neurology*, *76*(1), 95–100.