PÉCSI TUDOMÁNY EGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIA INTÉZET

36.OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

AZ ALZHEIMER KÓR PATOMECHANIZMUSA TRANSZGÉN EGÉREN VIZSGÁLVA: A NŐI NEMI HORMON PROGRESSZIÓT GYORSÍTÓ HATÁSA

Témavezető: Prof. Dr. ZELENA DÓRA
Egyetemi tanár

Készítette: SÓLYOMVÁRI CSENGE
(urkqdu)

BIOLÓGIA BSC

Pécs 2022

Tartalomjegyzék

I. Absztrakt 4

II. Bevezetés 5

II.1. Az Alzheimer kór jellemzése 5

II.1.1 Tünetek 5

II.1.2 Rizikó faktorok 5

II.1.2.1. Életkor 6

II.1.2.2. Genetikai háttér 6

II.1.2.3. Nemi különbségek 7

II.2. Agyi elváltozások 8

II.2.1. Agyterületek 8

II.2.2. Amilod plakkok 9

II.2.3. Tau fehérjék 10

II.3. Női nemi hormonok hatása 10

II.3.1. Ösztrogének 10

II.3.2. Progeszteron 15

II.4. Ovariektómia, mint a menopauza modellje 16

II.5. Az Alzheimer kór háromszorosan transzgén egérmodellje (3xTg-AD) 16

III. Célkitűzés 17

IV. Eszközök és módszerek 18

IV.1 Kutatási terv 18

IV.2. Állatok 18

IV.3. Ovariektómia (OVX) 18

IV.4. Mágneses rezonancia vizsgálat (MRI) 19

IV.5. Magatartási vizsgálatok 19

IV.5.1. „Y-Maze” (y-labirintus) 19

IV.5.2.„Szociális diszkrimináció” teszt (SD) 20

IV.5.3. „Fox odor” (rókaszag) teszt: 21
IV.6. Morfológiai vizsgálatok 21
IV.6.1. Hematoxilin-eozin 22
IV.6.2. Immunhiszokémia 22
IV.7. Statisztikai analízis 2324
V. Eredmények és kiértékelés 24
V.1. MRI-vel mért testösszetétel változás 24
V.2. Magatartási vizsgálatok 26
V.2.1. „Y-Maze” (y-labirintus) 26
V.2.2. „Szociális diszkrimináció” teszt (SD) 27
V.2.3. „Fox odor” (rókaszag) teszt 28
V.3. Morfológiai vizsgálatok 29
V.3.1. Hematoxilin-eozin festés 29
V.3.2. β-amiloid felhalmozódás a különböző agyi területeken 30
V.3.3. Morfológiai vizsgálatok a kolinerg rendszerben 32
VI. Következtetések 34
VII. Köszönetnyilvánítás 36
VIII. Rövidítésijegyzék 3637
IX Hivatkozott irodalmak jegyzéke 3738
X. Nyilatkozat az írásmű eredetiségéről ..... **Hiba! A könyvjelző nem létezik.**42

I. Absztrakt

Az Alzheimer-kór (AD) a demencia leggyakoribb típusa, ami egy progresszív neurodegeneratív betegség, mely nőkben, különösen menopauza után, mikor a nemi hormonszintek lecsökkennek, sokkal gyakoribb, mivel ezek a hormonok bizonyítottan neuroprotektívek. A menopauza a petefészkek eltávolításával (ovariektómia, OVX) modellezhető az állatokban. Célunk, hogy igazoljuk az OVX demenciát gyorsító hatását arra érzékeny modellállaton, kognitív tüneteket mutató háromszorosan transzgén (3xTg-AD) nőstény egereken. Mivel irodalmi adatok szerint ezen állatokban 6 hónapos korban mutathatók ki először agyi elváltozások, ezért 3 hónapos állatok petefészkeit távolítottuk el és 1 hónappal később az állatok testösszetételét mágneses magrezonancián alapuló módszerrel mértük, magatartási teszteket végeztünk, majd agymintákat gyűjtöttünk. A fő feladatom az agyi elváltozások immunhisztokémiai detektálása volt. A feldolgozás során az egéragyat koronálisan metszettük, majd immunhisztokémiai módszerrel festettük, mely során a különböző agyterületeken megjelenő neurofibrilláris kötegeket (tau-fehérjék) és senilis (β-amiloid) plakkokat vizsgáltuk. Mivel a kolinerg rendszer erősen érintett AD-ben, ezért a bazális előagyi kolinerg sejtek számát, valamint az acetilkolinészteráz pozitív rostok denzitását a szomatoszenzoros kéregben is feltérképeztük. Eredményeink alátámasztották, hogy ugyan magatartási szinten nem volt kimutatható az AD progressziója, de mind a β-amiloid felhalmozódás a bazolaterális amigdalában, mint az acetilkolinészteráz pozitív rostdenzitás csökkenése kifejezettebb volt OVX hatására. Összességében OVX után a 3xTg-AD egerek már fiatalabb korban is használhatóak lehetnek új terápiás anyagok hatásának vizsgálatára strukturális szinten, de a magatartási hatások felméréséhez későbbi időpontra lehet szükség.

II. Bevezetés

A neurodegeneratív betegségek előfordulása egyre gyakoribb társadalmi, és szociális probléma. Előrejelzések alapján 2050-re az idősek száma meghaladja a fiatalokét, nagyjából minden ötödik ember 60 éves vagy afeletti lesz (Riedel et al., 2016). A demencia elsősorban a 65 év felettieket érinti (Ferreira-Vieira et al., 2016), ezek alapján könnyen belátható, hogy a korosodó társadalomban nőni fog ezen betegek aránya. A neurodegeneratív betegségek leggyakoribb formája az Alzheimer-kór (AD) ami főként a magasabb kognitív funkciókat érinti. A betegség gyors előrehaladása hatással van az egyed és családtagjainak életminőségére, valamint súlyos terhet ró a társadalomra és a világgazdaságra egyaránt. A jelenlegi terápiák nem állítják meg a betegség lefolyását, ezért ezek hiánya tovább növeli a betegség kutatásának a fontosságát (Ferreira-Vieira et al., 2016; LaFerla & Oddo, 2005). Ez indokolja témaválasztásomat.

II.1. Az Alzheimer kór jellemzése

A betegséget először 1906-ban írták le. Azóta is kutatások folynak a betegség patomechanizmusának megértése, diagnosztizálása és egy hatásos kezelési mód kifejlesztésének érdekében. Az AD egy posztmortem diagnózis, amit a szövettani vizsgálatok alapján lehet kimondani (Ahmed et al., 2021). Napjainkban már *in vivo* is kimutathatók a különböző fehérje lerakódások (pl: β-amiloid (Aβ) plakkok) pozitron emissziós tomográfiával (PET). A PET egy molekuláris képalkotó rendszer, amely a molekuláris kölcsönhatásokat mutatja ki különböző biológiai folyamtokban (Zhang et al., 2021).

II.1.1 Tünetek

Az AD legjellemzőbb klinikai tünetei közé tartoznak a memória zavarok, cirkadián ritmus felborulása, hangulat ingadozás és depresszió (LaFerla & Oddo, 2005). Első tünetként a rövidtávú memória romlása jelenik meg, amit alvászavar és depresszió követhet ("2020 Alzheimer's disease facts and figures," 2020; Lyketsos et al., 2011). Az AD esetében egy progresszív neurodegeneratív betegségről beszélünk, vagyis az idő előre haladtával a tünetek fokozatosan súlyosbodnak.

II.1.2 Rizikó faktorok

Az AD kockázati tényezői között legfontosabb az életkor, a genetikai profil, a nem, illetve az életmód, mint például a fizikai aktivitás hiánya, a nem megfelelő táplálkozás, vagy a dohányzás ("2020 Alzheimer's disease facts and figures," 2020).

II.1.2.1. Életkor

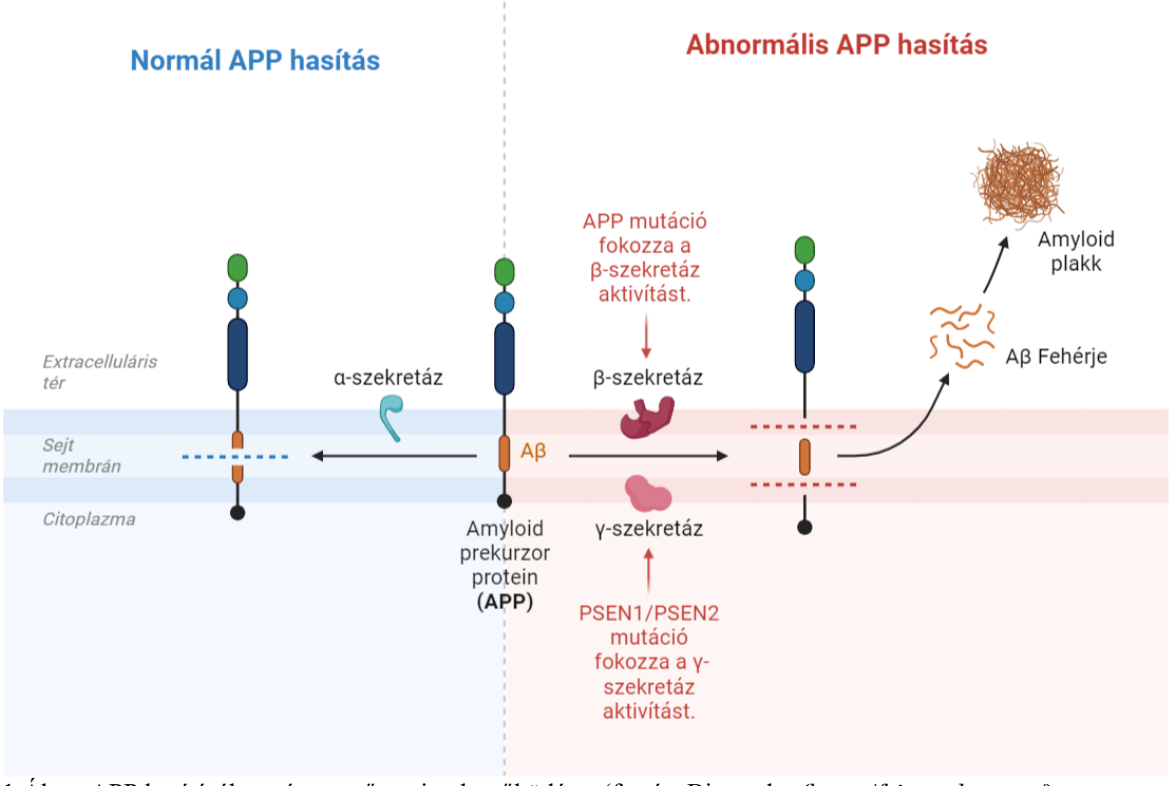
Az AD leginkább a 65 év felettieket érinti (Ferreira-Vieira et al., 2016) és mivel az öregedés egy összetett, progresszív folyamat, ez megnöveli az AD kockázatát, a mitokondriális diszfunkción, az Aβ plakkok formálódásán, a tau hiperfoszforiláción és a koleszterin homeosztázis zavarán keresztül (Riedel et al., 2016). Az AD-s betegek aránya nagy mértékben nő az életkor növekedésével: 65-74 évesek 3%-a, 75-84 évesek 17%-a, míg 85 vagy annál idősebbek esetén már a lakosság 32%-a szenved AD-ban ("2020 Alzheimer's disease facts and figures," 2020).

II.1.2.2. Genetikai háttér

A kor mellett kiemelkedő rizikó faktor a genetika. A genetikai alapon létrejövő AD-ra jellemző, hogy a korai életkorban is kialakulhat. Összesen öt darab gént azonosítottak, ami hozzájárul a genetikai AD kialakulásához: Apolipoprotein E (ApoE) ε4 allélja, az amiloid prekurzor protein (APP), presenilin-1 (PSEN1), presenilin-2 (PSEN2), és a mikrotubulus-asszociált protein tau (MAPT). Ezen gének mutációi fokozzák a Aβ felhalmozódást és a tau fehérje felhalmozódást (Hori et al., 2015; Riedel et al., 2016).

Az ApoE egy lipid kötő fehérje, ami a koleszterin és triglicerinek szállításában játszik fontos szerepet. Különösen fontos a koleszterin transzportban, ezáltal a membránok fenntartásában a központi és perifériás idegrendszerben egyaránt. Az ApoE ε4 hibás működése növeli a szív- és érrendszeri betegségek, valamint a neurodegeneratív betegségek kialakulását (Cacace et al., 2016; Riedel et al., 2016). Továbbá, jelenléte növeli a Aβ lerakódások számát (Hori et al., 2015). Az ApoE ε4 allél jelenléte a nemek közt is különbséget mutat, nőknél nagyobb kockázatot jelent, mint férfiakban (Pike, 2017). Az APP, egy transzport fehérje, amelynek a hasításában 3 féle enzim vesz részt: az α, β, γ szekretáz (fiziológiás szerepét lásd később). Az α szekretáz működése során egy nem toxikus peptid jön létre, míg a β és γ szekretáz esetén egy rövidebb, könnyen felhalmozódó fehérje keletkezik (Aβ) (1.ábra). A Aβ két leggyakoribb toxikus formája a $A\beta_{40}$ és az $A\beta_{42}$, az utóbbi a hidrofób tulajdonsága miatt könnyebben aggregálódik. Az APP gén mutációja növeli a β-szekretáz működését (Guo et al., 2021). A PSEN1 és PSEN2 gének részt vesznek a γ szekretáz kódolásában. A két gén bizonyos mutációja következtében nő a γ szekretáz aktivitása, ezáltal több Aβ fog felhalmozódni (Wu & Wu, 1988). A MAPT gén mutációja elősegíti a foszforilált tau proteinek kialakulását (Goedert et al., 1992).

Az APP, PSEN1, és a tau emberben is megtalált génmutációi felhasználásával létrehozták a kísérleteinkben is használt háromszoros transzgén AD (3xTg-AD) állatmodellt, amely három humán mutációt hordoz. A modell széles körben elterjedt, jól jellemzi a betegséget.



1.Ábra: APP hasításában résztvevő enzimek működése. (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

II.1.2.3. Nemi különbségek

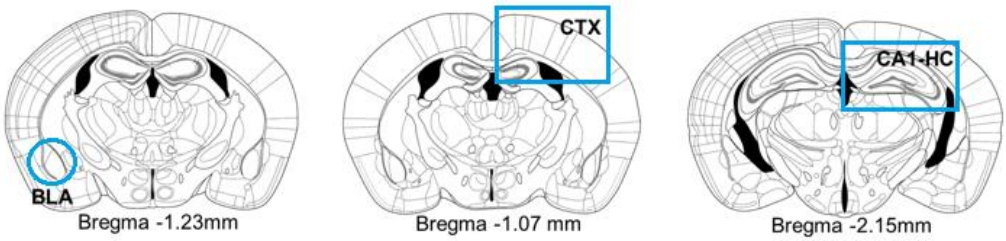
Az életkor és a genetikai prediszpozíció mellett a harmadik rizikó faktor a nem. A betegség kialakulásában és lefutásában a nők és a férfiak különbséget mutatnak, ami összefügghet a nemi hormonokkal és azok életkor során bekövetkező változásával (Pike, 2017). Különösen igaz ez azért, mert az AD előfordulása menopauza után megnő a nőkben (Scheyer et al., 2018). Menopauza idején erőteljesen csökken a női nemi hormonok szintje, melyek neuroprotektív hatása bizonyított (lásd később). Az AD-s betegek közel kétharmada nő (Pike, 2017).

A rizikó faktorok egymással kölcsönhatásban működnek, amit alátámaszt, hogy az ApoE ε4 mutációval rendelkező nőknél nagyobb a kognitív károsodás, mint az ApoE ε4 negatívaknál (Pike, 2017).

II.2. Agyi elváltozások

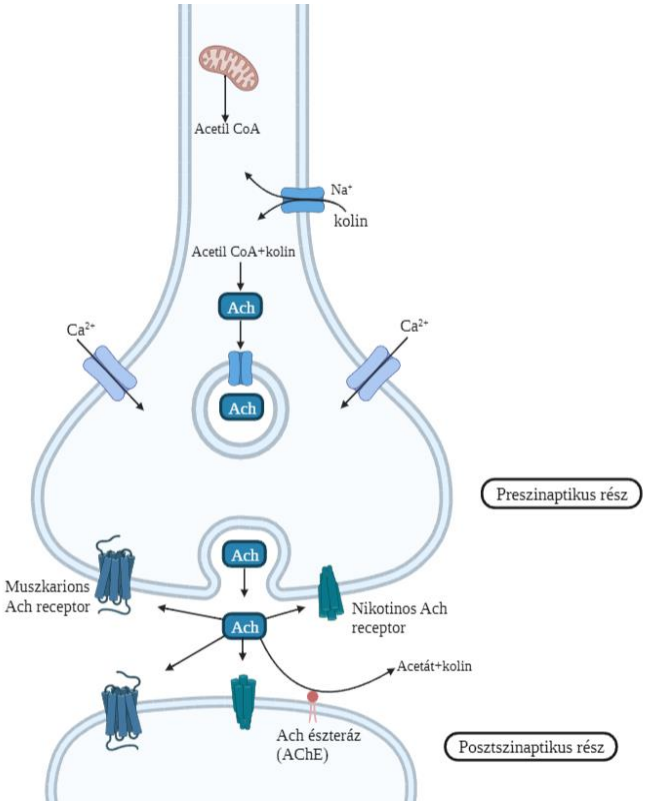
II.2.1. Agyterületek

A tüneteknek megfelelően a hippokampusz, mint a memória egyik legfőbb központja, valamint az érzelmek szervezésében kulcsszerepet játszó amigdala régiók érintettek (2. ábra). Természetesen a felsőbb agyi funkciók érintettsége az agykéreg szerepére is utal (LaFerla & Oddo, 2005).

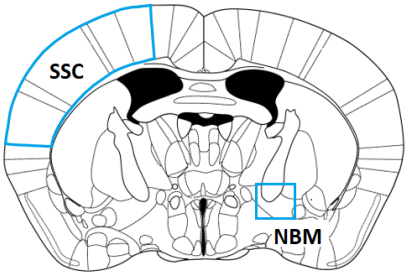


2. Ábra: Aβ lerakódások által érintett agyterületek (BLA: basolaterális amygdala, CTX: szomatomotoros kéreg, CA1-HC: hippokampusz CA1 régió. (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4. kiadása segítségével).

Az AD neuropathológiájában kiemelkedő szerepet játszik a kolinerg idegrendszer zavara, legfőképp a bazális előagyi kolinerg sejtek csökkent működése, illetve száma. (Schmitz et al., 2016; Whitehouse et al., 1982). A nucelus basalis magnocellulárisban (4.ábra) található egy fontos kolinerg sejtcsoport, melynek sejtjei csak az azonos oldali szomatoszenzoros (4.ábra) kéregbe küldenek kolinerg rostokat.



3. Ábra: Az acetilkolin (ACh) szintézise acetil-CoA-ból és kolinból. (forrás: Biorender (https://biorender.com/)



4. Ábra: Kolinerg idegrendszeri zavar által érintett agyterületek NBM: nucelus basalis magnocelluláris, SSC: szomatoszenzoros kéreg. (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4. kiadása segítségével).

Az acetilkolint (ACh) a kolin-acetil-transzferáz (ChAT) szintetizálja acetil-CoA-ból és kolinból (3. ábra). A folyamat a citoplazmában zajlik le, majd a szinapszisba vagy perifériára jutva az ACh nikotinos és muszkarinos receptorokon fejti ki hatását (3. ábra). Mivel az ACh kis molekula, a kolinerg sejtek kimutatása a ChAT enzim jelenlétének kimutatásán alapszik.

A kolinerg neuronok beidegzik az agykéreget és a hippokampuszt, ezáltal olyan fontos élettani folyamatokban vesznek részt, mint a memória, tanulás, alvás ébrenlét, és különböző stresszfunkciók. A sejtek pusztulása szorosan összefügg a memória romlással, a cirkadián ritmus felborulásával, vagy a figyelemzavarral. Az AD során a ChAT pozitív sejtek pusztulása figyelhető meg (Wu et al., 2021), valamint a megmaradt sejtek ChAT aktivitásának csökkenése jellemző (Wu et al., 2021). Emellett azt is kimutatták, hogy az acetilkolin észteráz (AChE) ami a felesleges ACh-t hidrolizálja, képes kölcsönhatásba lépni a Aβ-dal és elősegíti az amiloid plakkok kialakulását (Ferreira-Vieira et al., 2016). Jelenleg az AD terápiájában a kolinerg rendszerre ható szerek terjedtek el, ezek további kutatása és módosítása is ígéretes lehet a betegség kezelésében (Coyle et al., 1983; Ferreira-Vieira et al., 2016).

II.2.2. Amilod plakkok

Az idegsejtek degenerációját az agyban felhalmozódó kóros fehérjék okozzák, melyek közül legismertebb a Aβ és a tau. Az Aβ fehérjék először oligomereket alkotnak majd plakkokba rendeződnek, míg a tauopátiákra a hiperfoszforilált tau aggregátumok jelenléte jellemző. Az Aβ peptidek a normál anyagcsere termékei, amelyek 36-43 aminosavból állnak. Ezek a fehérjék az APP proteolíziséből származnak (Guo et al., 2021). Az APP normál működése esetén egy nem toxikus fehérje keletkezik (Guo et al., 2021). A kóros fehérje felhalmozódás okozhat energia deficitet azáltal, hogy károsítja a mitokondriális funkciót, emellett zavarhatja a kalcium (Ca^{2+}) ion háztartást, ami szinaptikus diszfunkcióhoz vezethet. Az Aβ megzavarja az agy glükóz metabolizmusát is, gátolja a glükóz transzportereket, így csökkentve a glükóz transzporter 1 és 3 (GLUT1, GLUT3) mennyiségét a központi idegrendszerben, amely csökkent agyi glükózellátáshoz vezet (Guo et al., 2021).

II.2.3. Tau fehérjék

A Aβ lerakódás befolyásolja a citoszkeleton felépítését, ennek következtében súlyosbíthatja a hiperfoszforilált Tau proteinek kialakulását. A tau proteinek fiziológiás esetben is megtalálható az axonokban, viszont itt oldható formában vannak jelen, elősegítik a mikrotubulusok stabilítását és szerveződését, részt vesznek a vezikuláris transzportban. A foszforilált tau fehérjék nem oldhatóak, intracelluláris aggregátumokat képeznek és nincs affinitásuk a mikrotubulusokhoz (LaFerla & Oddo, 2005; Querfurth & LaFerla, 2010).

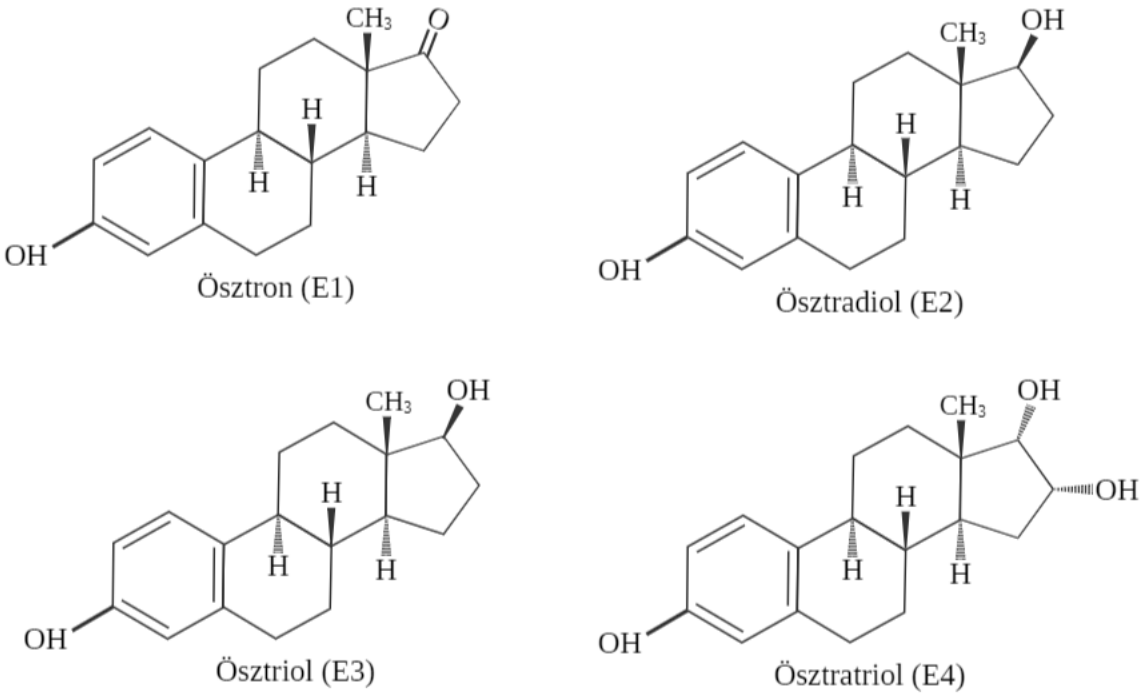
II.3. Női nemi hormonok hatása

Mivel az AD menopauza után gyakrabban alakul ki, ezért feltehetjük, hogy az ebben az időszakban lecsökkenő hormonok szintje (elsősorban az ösztrogéné) tehető ezért a felelőssé.

II.3.1. Ösztrogének

II.3.1.1. Ösztrogének szintézise

A nők elsődleges nemi hormonja az ösztrogén, melynek négy fajtáját különböztetjük meg: ösztradiol, ösztriol, ösztratriol és az ösztron (5. ábra). Termékenységi időszakában a legaktívabb az ösztradiol (E2, $C_{18}H_{24}O_2$), amit később a menopauza során az ösztron ($C_{18}H_{22}O_2$) vált fel. Kémiai szerkezetüket tekintve a szterán vázas (gonán váz) hormonok családjába tartoznak, tehát 4 gyűrű (A,B,C,D) kondenzációjával alakulnak ki. Közös tulajdonságuk az A gyűrű aromás mivolta, a C3-as pozícióban található hidroxil csoport, valamint a C13-nál elhelyezkedő metil csoport. A D gyűrű funkciós csoportjai különböznek az egyes ösztrogén-vegyületek közt (Shoham & Schachter, 1996).

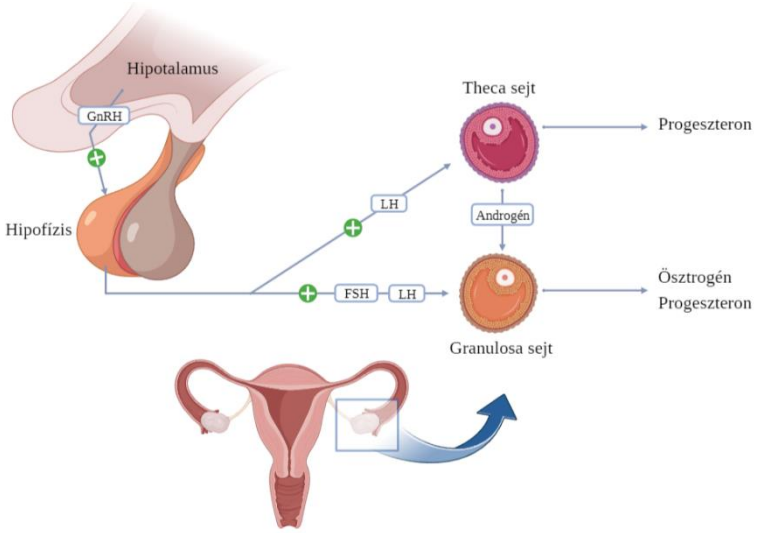


5. Ábra: Az ösztrogén molekulák szerkezeti képlete (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

A hormonok szerkezeti sajátosságai fogják befolyásolni a receptorhoz való affinitásukat és ezáltal a hatásukat is.

A szteránvázas hormonok koleszterinből szintetizálódnak és nem képesek raktározódni. Az E2-t első sorban a petefészek hormontermelő sejtjei állítják elő. Szintézise a granulosa- és theca interna sejtekben játszódik le, a két sejt egymásra is hatással van, a szintézis köztes termékei képesek egyik sejtből a másikba jutni és ott tovább alakulnak (6. ábra). Mivel a szintézis összes enzime nem található meg egyik sejtben sem, ezért hormontermelés csak akkor játszódik le, ha mind a két sejt jelen van. A petefészek hormon termelését a hipofízis két hormonja a luteinizáló hormon (LH) és a follikulus stimuláló hormon (FSH) szabályozza elsősorban. Az ovárium theca interna sejtjei LH receptorral, míg a granulosa sejtek FSH és LH receptorral is rendelkeznek. A hipotalamuszból származó gonadotropin elválasztást serkentő hormon (GnRH) epizodikus szekréciójának hatására a hipofízis elülső lebenyében megindul az LH és FSH termelés. Az utóbbi két hormon fogja serkenteni a theca és granulosa sejtek ösztrogén és progeszteron termelését. Az ösztrogén és progeszteron autokrin és parakrin módon hatnak a hormon termelő sejtekre is, növelik az LH és FSH receptorok mennyiségét a sejtek felszínén, ezzel növelik a hormonok (Fonyó Attila, 2011; John E. Hall, 2020). A theca sejtek progeszteront és androsztendiont vagy más néven gyenge androgént fognak előállítani koleszterinből. Az androsztendion a lamina basalison keresztül jut be a granulosa sejtekbe, ahol egy aromatáz

enzim segítségével tesztoszteronná vagy egyből ösztronná (E1) vagy ösztradiollá (E2) alakul, majd egy hidrolizáció után ösztriol (E3) is keletkezik.



6. Ábra: A hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely, Rövidítések: GnRH: Gonadotróp elválasztást serkentő hormon, LH: Luteinizáló hormon, FSH: Follikulus stimuláló hormon. (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

A petefészken kívül is történik ösztrogén termelés a zsírszövetekben és a mellékvesében egyaránt, ennek is köszönhető, hogy a menopauza után is egy ideig fennmarad az ösztrogén szint. Az ösztrogének csak kis része van jelen szabad állapotban, általában a szteroid hormon kötőfehéréhez kapcsolódva találhatóak meg, és a szállításuk is ilyen formában történik.

II.3.1.2. Ösztrogének szerepe

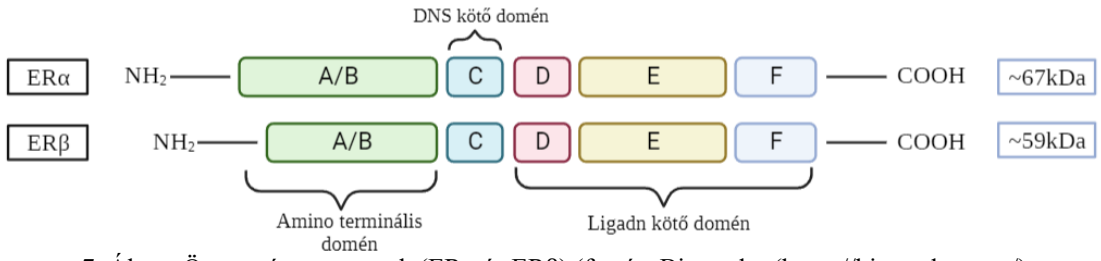
Az ösztrogén hormonok számos fiziológiás folyamatért felelősek, mint például a reproduktív funkciók, másodlagos nemi jellegek kialakítása, vázrendszer fejlődése és homeosztázisa. Mindezek mellett az ösztrogének biztosítják a pozitív és negatív visszacsatolást a hipofízis és hipothalamusz szintjén, ezzel fenntartva a normál hormon háztartást. Serkentik a hipofízis elülső lebenyének LH-szekrécióját, indukálják a progeszteron receptorok bioszintézisét (Fonyó Attila, 2011).

II.3.1.3. Ösztrogén receptorok

Az ösztrogén hormonok két féle klasszikus receptoron képesek kifejteni a hatásukat, ezek az ösztrogén receptor alfa (ERα) és béta (ERβ) (7. ábra). A két receptor más kromoszómán kódolódik, és más a szöveti eloszlásuk is: míg, az ERα a reproduktív szervekben, zsírszövetben, csontokban, vesében, mellékvesében fordul elő, addig a ERβ a petefészekben, prosztatában a leggyakoribb, de előfordul a herében, méhben, húgyhólyagban és a tüdőben is. Eloszlásuk a központi idegrendszerben is különbséget mutat: Az ERα elsősorban a hipotalamuszban és a subtantia innominátában expresszálódik, míg a ERβ a kéregben, hipokampuszban és a

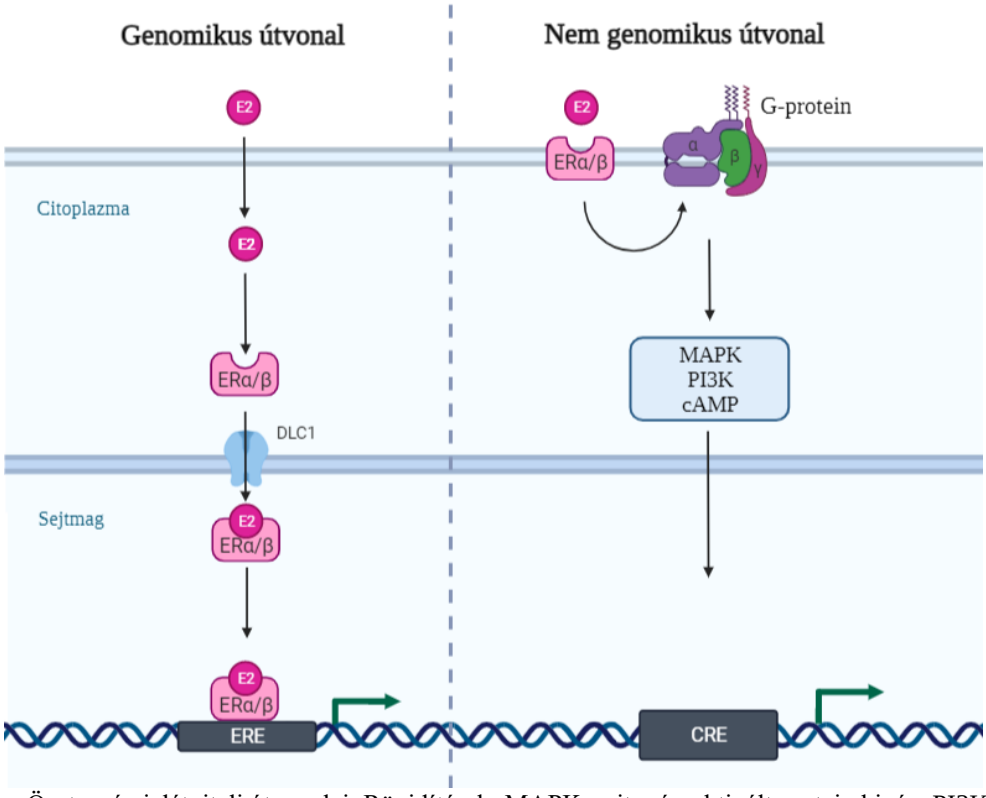
szaglólebenyben. Ezek alapján az ösztrogén egyértelműen hatással van az idegrendszeri működésre (Lu & Herndon, 2017; Shughrue et al., 1997).

Az ösztrogén receptorok intracelluláris transzkripciós faktorok, melyek ligand aktivált formája specifikus DNS régiókhoz kötődve befolyásolja számos mRNS átíródását. A receptorok három funkcionális domént tartalmaznak: ezek az NH2 terminális (A/B domén), a C terminális, ami egy DNS kötő domén, és a D/E/F terminális vagy ligand kötő domén. A két receptor csak a D/E/F régióban tér el, ami a transzkripciós fehérje megkötésére szolgál. Emiatt a méretükben is különböznek: az ERα (kb. 67kDa) nagyobb, mint a ERβ (kb. 59 kDa) (5. ábra) (Kuiper et al., 1997; Tremblay et al., 1997).



7. Ábra.: Ösztrogén receptorok (ERα és ERβ) (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

A receptorhoz kötődés után két féle jelátviteli útvonalat indíthatnak be, genomikus vagy a nem genomikus útvonalat (8. ábra) (Fuentes & Silveyra, 2019; Nalvarte et al., 2021). A genomikus hatás egy néhány napos, lassú hormonválaszt alakít ki. A szteroid hormon a lipofil természete miatt diffúzióval bejut a sejt belsejébe, majd ott intracelluláris receptorhoz kapcsolódva a sejtmagban transzlokálódik ahol a hormon-receptor komplex - a megfelelő célgén promoter régiójához kötődve - pozitív vagy negatív hatást fejt ki az mRNS átíródására, ezzel befolyásolva a fehérje termelést. A nem genomikus útvonal ezzel szemben egy gyors néhány perces hormonválaszt vált ki. Membrán receptorokon hat és ebben az esetben nem történik új gének átíródása, hanem G-fehérje kapcsolt útvonalak vagy más másodlagos jelátviteli (pl: mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) vagy ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP)) útvonalak aktiválódnak (Fuentes & Silveyra, 2019; Lu & Herndon, 2017; Marino et al., 2006).



8.Ábra: Ösztrogén jelátviteli útvonalai. Rövidítések: MAPK: mitogén-aktivált protein kináz, PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz, cAMP: ciklikus-adenozin-monofoszfát, CRE: cAMP kötő elem (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

II.3.1.4. Ösztrogén neuroprotektív hatása

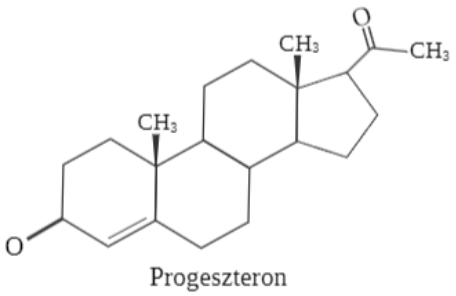
Az ösztrogén és a progeszteron nemi hormonok, így a nemi szervek felépítésén túl az idegrendszer működésében és fejlődésében is szerepet játszanak, mintegy női irányba programozva azt.

Mindkét hormon bizonyítottan neuroprotektív hatású (a progeszteront lásd később). Az AD vonatkozásában az ösztrogén képes az APP fehérje működését befolyásolni, aminek köszönhetően kevesebb kóros fehérje fog keletkezni. Különböző jelátviteli útvonalakat beindítva gátolja a neuronok apoptózisát. Ez a folyamat a kolinerg neuronokban is lejátszódhat, amik különösen érintettek AD-ben. Az ösztrogén szabályozza az idegrendszer növekedési faktorait, és befolyásolja a mitokondriális működést. Mindezek mellett antioxidánsként is működik, csökkenti az oxidatív stressz okozta károsodásokat, gyulladás csökkentő, és hatással van a mikrogliák aktivitására is. Ezekkel a hatásokkal az ösztrogén csökkentheti a neurodegeneratív betegségek kialakulásának esélyét (Arnold & Beyer, 2009; Brotfain et al., 2016; Granholm, 2000; Wang et al., 2002).

II.3.2. Progeszteron

II.3.2.1. Szintézis

Az ösztrogén mellett a másik fontos női nemi hormon a progeszteron. Szerkezetét tekintve ez is szterán vázas hormon (9. ábra).



9. Ábra: Progeszteron kémiai szerkezete (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

A progeszteron is koleszterinből szintetizálódik, aminek az elsődleges forrása a vérplazmában lévő low-density lipoprotein (LDL) (Metherall et al., 1996). A koleszterin pregnenolonná, majd progeszteronná alakul (Guennoun, 2020). Ez a köztes lépés minden, szteroid hormont előállító szervben létrejön, de a legtöbben a folyamat tovább megy és így nem a progeszteron lesz a végtermék. A progeszteron szintézis elsődleges helyszíne a petefészek theca- és a granulosa sejtjei (6. ábra), ezek mellett még termelődik a sárgatestben és a terhesség ideje alatt a placentában is. Bár kis mennyiségben, de a mellékvesekéregben is előfordulhat progeszteron szintézis (Singh & Su, 2013).

II.3.2.2. Progeszteron szerepe és neuroprotektív hatása

A hormon elsődleges feladata a női nemi működés, és a terhesség fenntartása, ösztrogén antagonistaként is funkcionálhat, például gátolhatja az ösztrogén hatását a csontokra (Singh & Su, 2013).

Az ösztrogénhez hasonlóan a progeszteronnál is figyelhetünk meg neuroprotektív hatást. A progeszteronnak és egyéb származékainak mint például a 3α-5α-THPROG (3α,5α-tetrahydroprogeszteron) vagy a 5α-DHPROG (5α-dihidroprogeszteron), bizonyítottan protektív hatással vannak az idegsejtekre. Ezek a vegyületek különböző receptorokhoz kötve (pl:$GABA_A$) olyan jelátviteli útvonalakat aktiválnak, amik elősegítik az idegsejtek védelmét. A progeszteron serkenti a mineralizációt (csökkenti a demineralizációt), fokozza a mielin fehérje expresszióját. A genomikus útvonala (az ösztrogénhez hasonló) hatással van a neurotrofin termelődésre. A neurotrofin egy növekedési faktor, ami segíti az idegsejtek növekedését és túlélését. A progeszteron csökkenti az oligodentrociták degenerációját, ezáltal is növelve a

mielenizációt. Mindezek mellett gyulladáscsökkentő, és az ösztrogénnel együtt antioxidánsként is funkcionálnak, ezáltal is elősegítve a sejtek túlélését (Guennoun, 2020; Singh, 2006; Singh & Su, 2013).

II.3.2.3. Progeszteron receptorok

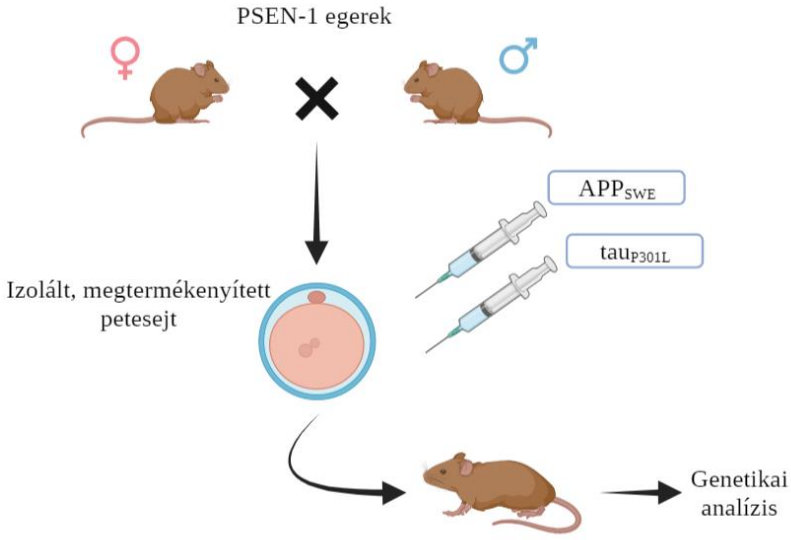
Az ösztrogénhez hasonlóan kétféle receptorát különítjük el: PR-A és PR-B. A két receptor kizárólag az N-terminálban különbözik, (Singh, 2006) és transzkripciós faktorként működnek. A hormonnak két fő jelátviteli útvonala van, a genomikus és a nem genomikus. Ezek hatásmechanizmusa hasonló az ösztrogén jelátviteli útvonalával (lásd feljebb), a genomikus útvonal intracelluláris receptorokon hat, míg a nem-genomikus membrán receptorokon keresztül (Garg et al., 2017; Singh & Su, 2013).

II.4. Ovariektómia, mint a menopauza modellje

A menopauza során bekövetkező hormonszint csökkenése a bilaterális ovariektómiával (OVX) modellezhető. Az OVX során a petefészkek eltávolítása történik, hormondepléciót vonva maga után. Az OVX növeli a testzsír felhalmozódást, valamint az elhízás esélyét. Csökkenti a kötő- és támasztószövetek arányát, és a csontsűrűséget (Mauvais-Jarvis, 2011). Emellett csökkenti még az uterusz súlyát és az endometrium mirigyezettségét (Quispe Calla et al., 2021).

II.5. Az Alzheimer kór háromszorosan transzgén egérmodellje (3xTg-AD)

Az állatmodellek fontos szerepet töltenek be a kutatásokban, ezek segítségével tudjuk vizsgálni a különböző betegségek patomechanizmusát. A kísérleteinkben 3x-Tg-AD állatmodellt használtunk, amely pozitív három gén mutációját tekintve. Az APP, PSEN1, és a tau génmutációra amik a humán betegséget is jellemzik (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Ezeket az egereket úgy hozták létre hogy: két független transzgént a tau_{P301L}-t és az APP_{SWE}-t együtt mikroinjektáltak, érett PSEN-1 mutáns állatok, megtermékenyített petesejtjébe (10.ábra). Az egerekben a három gén túlzott expressziója miatt az AD mindkét jellegzetes szövettani patológiája egyszerre figyelhető meg. A Aβ lerakódások és a neurofibrilláris kötegek először az agykéregben figyelhetők meg, majd 6 hónapos korban a hippokampusz területén is (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003).



10.Ábra: 3xTg-AD egerek létrehozásához használt technika. (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

Korábbi(Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003), hímeken végzett vizsgálatok során bizonyították, hogy a 3xTg-AD állatban számos magatartási és szövettani elváltozás detektálható, mely progresszív módon jelenik meg.

III. Célkitűzés

Az idősödő társadalmunk miatt az idő előre haladtával egyre több embert fognak érinteni a különböző neurodegeneratív betegségek, de ezek diagnosztizálása és kezelése még kezdetleges. Az AD hatékony megelőzése érdekében és új kezelési stratégiák kidolgozásához meg kell ismerni a betegség lefolyását, pathomechanizmusát és azt, hogy a különböző kockázati tényezők (kor, nem) hogyan befolyásolják a patogenezist. Statisztikai adatok alapján a nőknél sokkal gyakrabban jelenik meg a demencia mint férfiaknál. Bár az ösztrogén pótlása hatékony terápia lehet, de a mellékhatások (trombózis, rák) akadályozzák az alkalmazhatóságát. Mindenesetre új, kisebb mellékhatásspektrumú gyógyszerek teszteléséhez is célszerű lenne egy olyan állatmodell, melyben viszonylag hamar jelennek meg a demenciára jellemző tünetek. A betegség jól modellezhető viszonylag idős (min. 8 hónapos) háromszoros transzgén egérrel, mely homozigóta 3 mutációra (Belfiore et al., 2019; Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Másrészről a női nemi hormonok szintjének menopauza körüli esése jól modellezhető a petefészkek eltávolításával (OVX). Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az OVX meggyorsítja az AD-re jellemző magatartási és morfológiai tünetek kialakulását, mely esetén lenne a kezünkben egy viszonylag könnyebben alkalmazható modell (8 hó vs 3-4 hó), melyen

nemcsak a női nemi hormonok analógjai lennének jól tesztelhetőek, hanem más esetleges terápia is.

Jelen munkánk célja bizonyítani, hogy az OVX, azaz a női nemi hormonok eltávolítása meggyorsítja az AD tüneteinek megjelenését 3xTg-AD egér modellben.

IV. Eszközök és módszerek

IV.1 Kutatási terv

Jelen munkánkban a perifériás ösztrogén megvonás modellezésére 3 hónapos nőstény egerek petefészkét eltávolítjuk (OVX), 1 hónappal később az állatok testösszetételét mágneses rezonancia vizsgálattal mérjük, majd számos magatartási tesztet végzünk, melyek végén az állatokat feláldozzuk, agymintát gyűjtünk és morfológiai vizsgálatokat végzünk.

IV.2. Állatok

A kísérletben 3 hónapos 3xTg-AD (3xTg AD: B6;129-Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa Psen1tm1Mpm/Mmjax, Jackson Laboratories, Stock: 004807) egereket, és ezek kontroll (C57BL6/J) törzseit használtuk (Pairojana et al., 2021). A 3xTG-AD állatok homozigóták voltak három AD-vel kapcsolatos humán alapú genetikai mutációra: PSEN1, APP_{Swe} és tau_{P30IL} (Belfiore et al., 2019; Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003; Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Ebben a kísérletben csak nőstényeket használtunk. Az egerek életkora megfelel egy fiatal felnőtt ember életkorának. Az összes állatot a Kísérleti Orvostudományi Intézetben tenyésztették és helyezték el. Az állatokat fordított világos-sötét ciklusban tartottuk (8-20:00ig sötétbe voltak), a helységeiknek a hőmérséklete 22 ± 2 C° volt, az egerek számára a táp és a víz *ad libitum* elérhető volt (ösztrogén mentes étrendi korlátozások nélkül). Minden vizsgálatot jóváhagyott a munkahelyi és magyar állatjóléti bizottság (PE/EA/918-7/2019), és a European Communities Council Directive laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó ajánlásai (2010/63/EU) szerint végeztük el.

IV.3. Ovariektómia (OVX)

Az állatokat 3 hónapos korukban ovariektomiát vagy álműtétet (Sham) végeztünk ketamin-xilazin altatásban (dózis: 125 mg/kg ketamin és 25 mg/kg xilazin 0,9%-os sóoldatban oldva, 10 ml/kg koncentrációban intraperitoneálisan beadva). Az állatokat 4 csoportra osztottuk: 1.: Kontroll-Sham (n=8), 2.: Kontroll-OVX (n=9), 3.: 3xTg-AD-Sham (n=7), 4.: 3xTg-AD-OVX (n=12). A kísérleteket két sorozatban végeztük, mind a két sorozat tartalmazta mind a négy csoportot.

IV.4. Mágneses rezonancia vizsgálat (MRI)

Az OVX után 1 hónap elteltével Mágneses rezonancia vizsgálatot (MRI) végeztünk. Az egereken test-zsír %-ot, kötő-és támasztószövet %-ot, szabad és kötött víz mennyiséget, hidratáltsági fokot (HR) mérünk, amit a következő képen kapunk meg:

$$HR = \frac{Kötött\ víz - szabad\ víz\ mennyisége}{testzsír} * 100$$

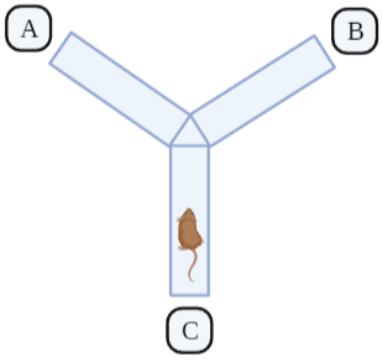
Emellett a kísérlet alatt folyamatos testtömeg monitorozás zajlott, mivel a menopauza során gyakori az elhízás, mely elősegíti a demencia kialakulását (Terzo et al., 2021).

IV.5. Magatartási vizsgálatok

Minden tesztet az aktív időszak első felében végeztünk (9:00 és 14:00 között). Az állatok viselkedését videóra vettük, majd később egy, a kísérleti beosztást nem ismerő személy elemezte ki azokat.

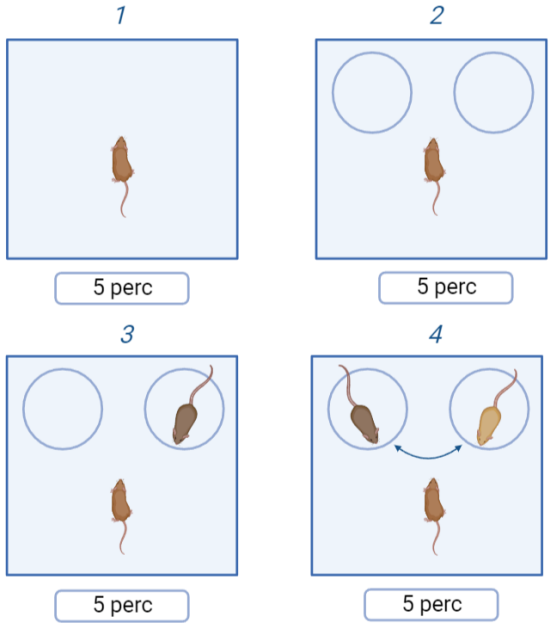
IV.5.1. „Y-Maze" (y-labirintus)

Az egynapos kísérlet során az állatokat Y alakú útvesztőbe helyeztük 10 percre, és megfigyeltük, hogy az egerek milyen sorrendben váltogatják a karokba való belépést, illetve megfigyeltük az állatok mozgékonyságát (11. Ábra). Jól funkcionáló munkamemória esetén az egér a régebben látogatott kar felé megy tovább (pl. ABC, CAB, BCA). Két állat között a labirintust 70%-os etanollal fertőtlenítettük.



11. Ábra: „Y-Maze" (y-labirintus) (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

IV.5.2.„Szociális diszkrimináció” teszt (SD)



12. Ábra: Szociális diszkrimináció teszt. (forrás: Biorender (https://biorender.com/)

A vizsgálatot egy 40x40x15 cm alapterületű, magas falú dobozban végeztük (Chaves et al., 2022) (12. ábra). Ez a teszt négy részből állt.

Az első felében az állatokat 5 percen keresztül habituáltuk az üres dobozhoz, mely során szabadon felfedezhették a területet és mozoghattak (open-field, OF). Ezt követően 5 percig két perforált doboz került az aréna két sarkába és az azokkal töltött időt figyeltük (tárgy- és oldalpreferencia). A következő 5 percben egy juvenilis – 25-30 napos, nem ivarérett – fajtárs stimulus állatot helyeztünk az egyik perforált doboz alá (a szociális állat több időt tölt az egeret tartalmazó doboz vizsgálatával, mint az üressel), amin keresztül vizuális és szagingerek terjedhetnek, azonban közvetlen interakcióra nincs lehetőség. 5 perccel később egy addig ismeretlen új állatot is hasonló módon behelyeztünk az arénába és figyeltük a szociális interakciók mértékét. Ha az állat emlékszik a régi, már ismert fajtársára akkor az új egér vizsgálatával fog több időt tölteni. A kapott adatokból szociábilitási és diszkriminancia indexet számoltunk. Az OF-ben a központi és perifériás zónákban eltöltött időt automatikusan elemezte a EthoVision XT (Noldus IT, Wageningen, The 153 Netherlands, version 15), a teszt többi részét a Solomon Coder program segítségével elemeztük. A szociábilitási indexet a következő képpen számoltuk ki:

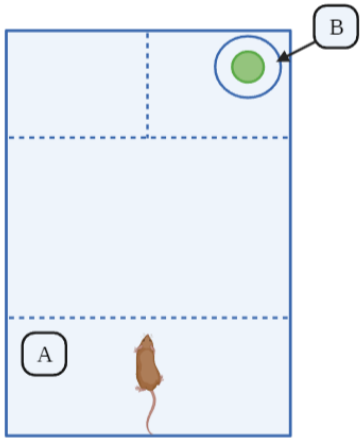
$$SD = \frac{az\ egeret\ tartalmazó\ ketrec\ szimatolásával\ eltöltött\ idő}{egeret\ tartalmazó\ ketrec + üres\ ketrec\ szimatolásával\ eltöltött\ idő} * 100$$

A diszkriminancia indexet (DI) a következő képen számoltuk ki

$$DI = \frac{Az\ új - régi\ egér\ szimatolásával\ eltöltött\ idő}{Az\ új + régi\ egér\ szimatolásával\ eltöltött\ idő} * 100$$

IV.5.3. „Fox odor" (rókaszag) teszt:

A kísérletet egy 43 × 27 cm alapterületű plexiüvegből készült dobozban végeztük (9. Ábra), egy elszívófülke alatt. A teszt során 2-metil-tiazolint (2-TM) használtunk, ami rókából származó szintetikus ragadozószag. Az üvegedény jobb sarkába egy műanyag kupakba 2-TM-el átitatott szűrőpapír helyeztünk. Az elemzés során a műanyagcső körül virtuálisan kijelöltünk egy 7x11 cm-es „szagzónát", a doboz szemközti részét (25%) pedig „kerülő zónának" jelöltük ki. Az állatot a kerülő zónába helyeztük, majd 10 percig szabadon mozoghatott, ez alatt figyeltük, hogy mennyi időt töltött el a szagzónában, a kerülő zónában, mozdulatlanságban (freezing), mosakodással, ágaskodással és felfedezéssel. A megtett távolságot, és a tartózkodás helyét az EthoVision Software 15 segítségével határoztuk meg. A részletesebb viselkedés vizsgálatok eredményeit a Salamon Coder program segítségével elemeztük ki.



13. Ábra: „Fox odor" (róka szag) teszt: A: Kerülési zóna B: Szagzóna,(forrás: Biorender (https://biorender.com/)

Kutatásunkban a fent említetteken kívül végeztünk más magatartási vizsgálatokat is, ezeket az alábbi cikkben részleteztük (Farkas et al., 2022)

IV.6. Morfológiai vizsgálatok

A morfológiai vizsgálatokhoz az állatokat dekapitáltuk, majd eltávolítottuk az agyukat, és 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatban post-fixáltuk. Az állatok uteruszát kivettük, majd lemértük az izolált méh súlyát és ezt a szövetet is 4% PFA-ban fixáltuk. A fixálódott agy és uterusz mintákat 30% cukor oldatban víztelenítettük, majd 30 µm vastagságú metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotommal (Leica SM2010 R).

IV.6.1. Hematoxilin-eozin

Az uterusz metszeteken hematoxilin-eozin festést végeztünk. A festés 6 lépésből állt: első lépésben 3x1 percig mostunk desztillált vízben, második lépésben 10 percre hematoxilin oldatba helyeztük, amelyet egy 10 percig csapvízben történő mosás követett. Mosás után 10 percre eozin oldatba helyeztük a mintákat, melyet ismét egy 3x1 perces desztillált vizes mosás követett. A festett metszeteket DPX-el (Sigma-Merck, #44581) fedtük. A kész mintákon megvizsgáltuk az uterusz hámrétegének vastagságát és az endometrium mirigyeinek integritását. A festéssel igazolhatjuk az OVX eredményességét, mivel a hormonszint csökkenés miatt az uterusz sorvadni kezd, kisebb lesz a hámréteg vastagsága és csökken az endometrium mirigyezettsége.

IV.6.2. Immunhiszokémia

Az amiloid plakkok kimutatását NiDAB-os immunhisztokémiai módszerrel végeztük. A kolinerg sejttesteket ChAT immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk meg, a substantia innominata nucleus basalis (SI-NBM) területén, míg a kolinerg rostok denzitását a szomatoszenzoros kéregben mértük acetilkolin észteráz (AChE) immunhisztokémiát követően.

A kész mintákat Nikon Eclipse E1 (Nikon,Tokyo, Japán) mikroszkóppal néztük és digitalizáltuk. A számítógépes kvantitatív képanalízishez az immunhisztokémiával festett metszetet a ImageJ/Fiji softver segítségével elemeztünk ki. Az $A\beta_{1\text{-}42}$ és az AChE immunhisztokémia esetében optikai denzitást számoltunk (IOD), míg a ChAT esetében leszámoltuk a sejtek mennyiségét.

IV.6.2.1. Amiloid-$\beta_{1\text{-}42}$ (Aβ) és Kolin-acetil-transzferáz (ChAT) immunhisztokémia

Az immunhisztokémiás festések során minden lépés után 3x10 percen keresztül TRIS-el (pH=7,6) mostuk a mintákat. Az Aβ festés elött egy 10 perces 100%-os hangyasavas kezelést is végeztünk, hogy az antitest által felismert epitópokat szabaddá tegyük. Az első mosás után 15 perces endogén peroxidáz gátlást alkalmaztunk, melynek célja, hogy a későbbiekben elkerüljünk az endogén peroxidáz által adott keresztreakciókat. A peroxidáz gátló elegy a következőket tartalmazta: 300 µl H_2O_2, 4mL metanol, 6mL TRIS. Ezt követően szobahőmérsékleten, rázópadon, 2 órán át egy háttér blokkoló elegyet alkalmaztunk (összetétele: TRIS, 2% triton X (TX)/ 10% Horse serum (HS)) a mintákon, hogy meggátoljuk keresztreakciók kialakulását, amelyek metszeteink „hátterét" növelnék. Majd az elsődleges antitestet tartalmazó elegyet pipetáztuk a mintákra, amely a két festés esetén különböző összetételű volt (ChAT: 1:1000, kecske antitest, 0,02% TX, 5% HS, TRIS-ben oldva;, Aβ:

1:500 nyúl antitest, 0,02% TX, 5% HS, TRIS-ben oldva). Az elsődleges antitesttel a mintákat 72 óráig 4 C°-on, rázópadon inkubáltuk. Az elsődleges antitest lemosása után egy másodlagos, biotinilált antitest oldatba (1:200, TBS/5% HS/0,02% TX, Aβ esetében anti-nyúl, ChAT esetében pedig anti-kecske) helyeztük a mintákat 2 órára szobahőmérsékleten. Az ezt követő 3x10 perces mosás után, avidin-biotin komplexet (VESCTASTAIN ABC-peroxidáz kit, Vector Labories, 10 mL TBS/ 5% Horse/ 0,02% TritonX) pipettáztunk a metszetekre, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az előhívást egy nikkel-diaminobenzidint (Ni-DAB) és glükóz-oxidázt tartalmazó oldattal végeztük. Első lépéseként készítettünk egy oldatot, amely tartalmazott 25 mL Nátrium-acetátban oldott 1,25 g Nikkel-szulfátot . Ezt követően az elegybe egyenként feloldottunk 200 mg glükózt, majd 40 mg ammónium kloridot, majd szűrőpapírral leszűrtük egy sötét üvegű edénybe. Következő lépésben 12,5 mg Diaminobenzidin-t (DAB) feloldottunk 25 mL desztillált vízben (dH_2O). Majd az egész oldatot szűrőpapírral leszűrve beleöntöttük a sötét üvegű edénybe. Utolsó lépésként a kész oldatba feloldottunk még 1,5 mg Glükóz-oxidázt. Festőkádba öntöttük a Ni-DAB oldatot, majd a metszeteket egyszerre belehelyeztük. A lilás szín megjelenését követően egy 3x10 perces TRIS mosással leállítottuk a reakciót. A kész metszeteket DPX-es fedéssel fixáltuk.

IV.6.2.2. Acetilkolin észteráz (AChE) immunhisztokémia

A festés első lépése egy 5x1 perces nátrium-acetát (0,1M, pH=6) mosás volt. Ezt követően 2x45 percre inkubációs puffert helyeztünk a mintákra (összetétele: 16,25 mL 0,1M-os nátrium-acetát/ 1 mL, 0,1M-os nátrium-citrát/ 2,5 mL 0,03M réz-szulfát/ 4,75mL desztillált víz/ 0,5mL 0,005M kálium-ferricianid/ 12,5mg acetiltiokolin-iodid). Az inkubációt egy 5x1 perces Na-acetát mosás követte. A mosás után a metszeteket 2 percre 1%-os ammónium-szulfid oldatba (22,8 mL Na-Acetát/ 1,2 mL ammónium-szulfid) helyeztük, majd 5x1 percig mostuk nátrium-nitráttal ($NaNO_3$). Következő lépésben a mintákra 1%-os ezüst-nitrát (12 mg $AgNO_3$ feloldva 12 mL $NaNO_3$) oldatot pipettáztunk, majd 2 perc után egy újabb 5x1 perces $NaNO_3$-mosást végeztünk. Végül egy újabb 5x1 perces Na-acetát mosást követően a mintákat felhúzásig TRIS-ben tároltuk. A kész mintákat DPX-el fedtük.

IV.7. Statisztikai analízis

A statisztikai analízisekhez és a hozzá tartozó ábrák elkészítéséhez a GraphPad Prism (verzió 6.0) programot használtuk. A csoportok összehasonlítására kétutas ANOVA tesztet (MRI, Y-labirintus, szociális diszkrimináció, „Fox odor” (rókaszag) teszt, és a szövettani elemzések), és a post-hoc elemzésnél Tukey HSD, valamint Student-féle t-tesztet (Aβ immunhisztokémia) alkalmaztunk. A szociális diszkrimináció tesztnél a két dobozka vizsgálatát ismételt méréses

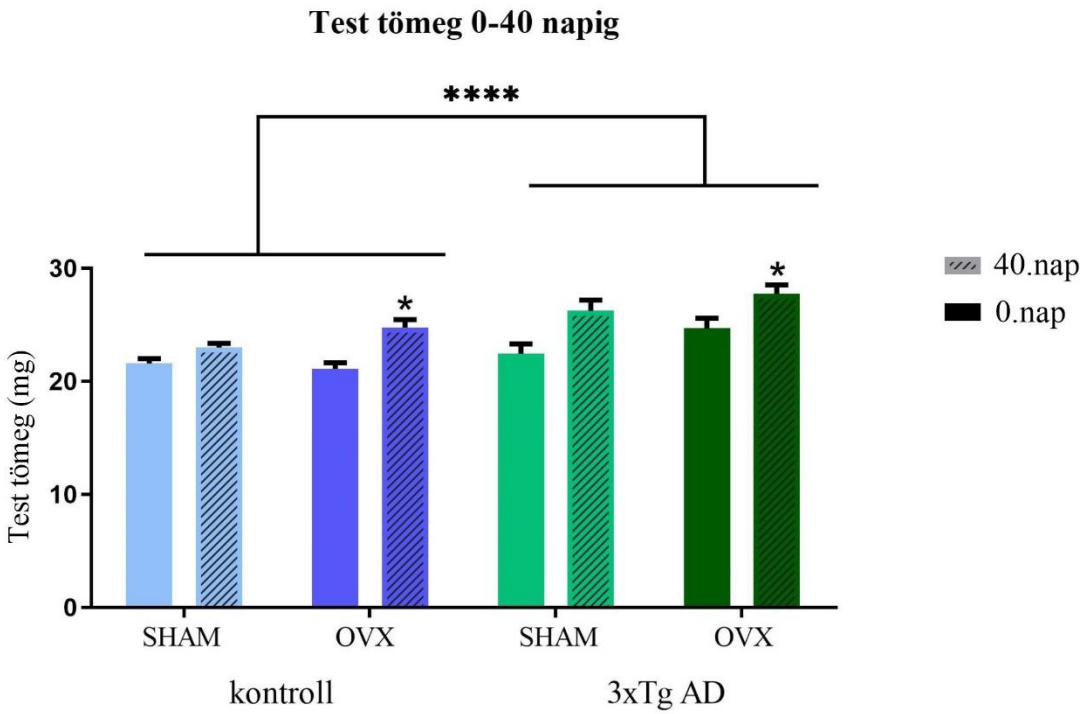
(repeated measure) ANOVA módszerrel hasonlítottuk össze, míg a szociabilitás tesznél minden egyes csoportra egyutas (singel sample) t-teszttel vizsgáltuk az 50%-tól (SD) vagy 0%-tól (DI) való eltérést. Az adatok a 4 csoport (1.: Kontroll-Sham, 2.: Kontroll-OVX, 3.: 3Tg-AD-Sham, 4.: 3Tg-AD-OVX) átlagai közti különbséget mutatják, az adatokat átlag ± SEM-ként adtunk meg. A szignifikáns különbséget $p<0,05$ esetén fogadtunk el.

V. Eredmények és kiértékelés

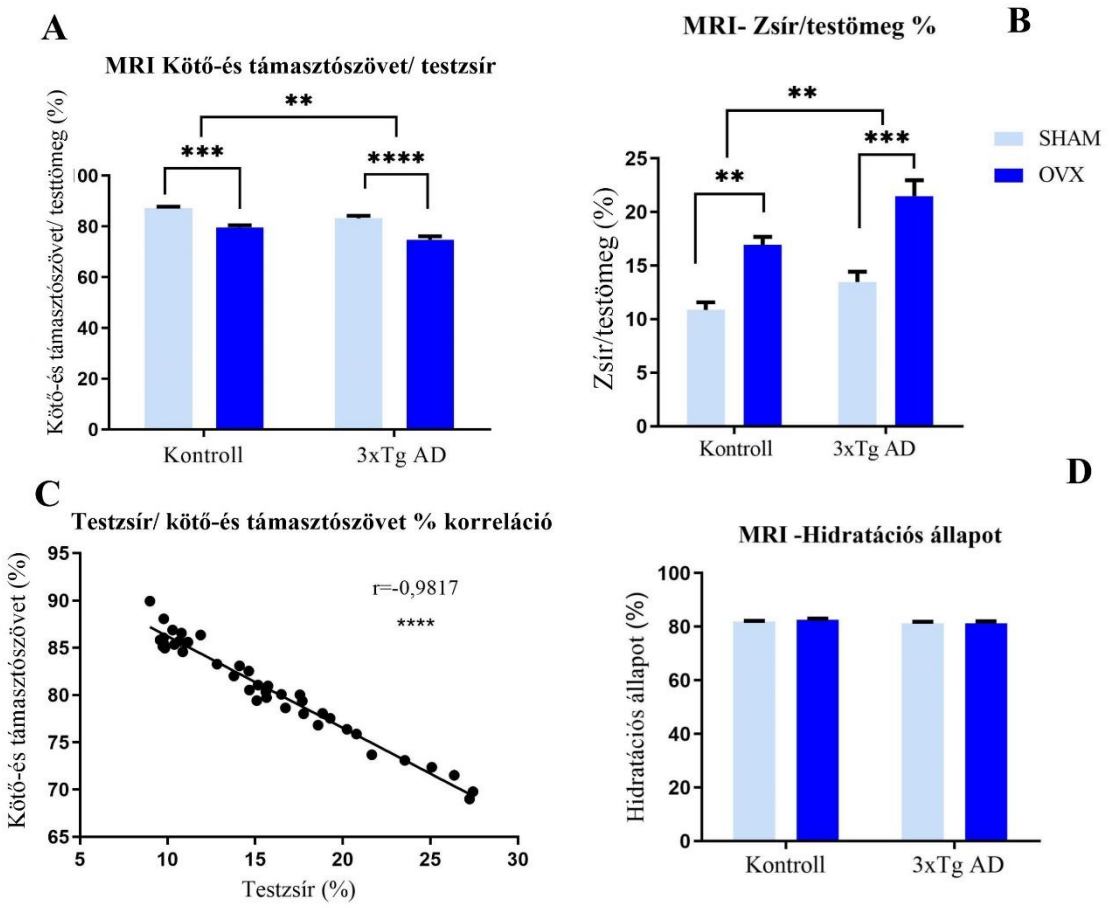
V.1. MRI-vel mért testösszetétel változás

A testsúly változásait tekintve különbséget találtunk a két genotípus között [$F_{(3,59)}=12,59$, $p<0,0001$], a 3xTg-AD egerek nehezebbek voltak, mint a kontroll állatok (10. Ábra). Az OVX genotípustól függetlenül növelte az állatok tömegét [$F_{(1,19)}=16,35$, $p=0,0007$].

A testtömeg növekedésének oka a testzsír növekedése, amire a genotípus is hatással volt: a 3xTg-AD állatok esetében nagyobb zsírfelhalmozódás volt megfigyelhető [$F_{(1,32)}=10,01$, $p=0,0034$] (15. Ábra). Az OVX mindkét genotípusban növelte a zsírfelhalmozódást [$F_{(1,32)}=38,38$, $p=0,0001$]. Ezzel szemben a kötő- és támasztószövet aránya csökkent [Genotípus: $F_{(1,32)}=11,97$, $p=0,0016$, OVX: $F_{(1,32)}=47,45$, $p<0,0001$]. Továbbá negatív korrelációt is meg figyeltünk a testzsír és a kötő- és támasztószövetek aránya között [$r=-0,9870$, $p<0,0001$]. Az összes állat hidratációs állapota a normál tartományban volt (80± 5%), erre sem a genotípus, sem az OVX nem volt hatással.



14. Ábra MRI: Az állatok testtömeg változását mértül a 0. naptól a 40. napig, a 3xTg-AD állatok nehezebbek voltak mint a kontrollok ($p<0,0001$).



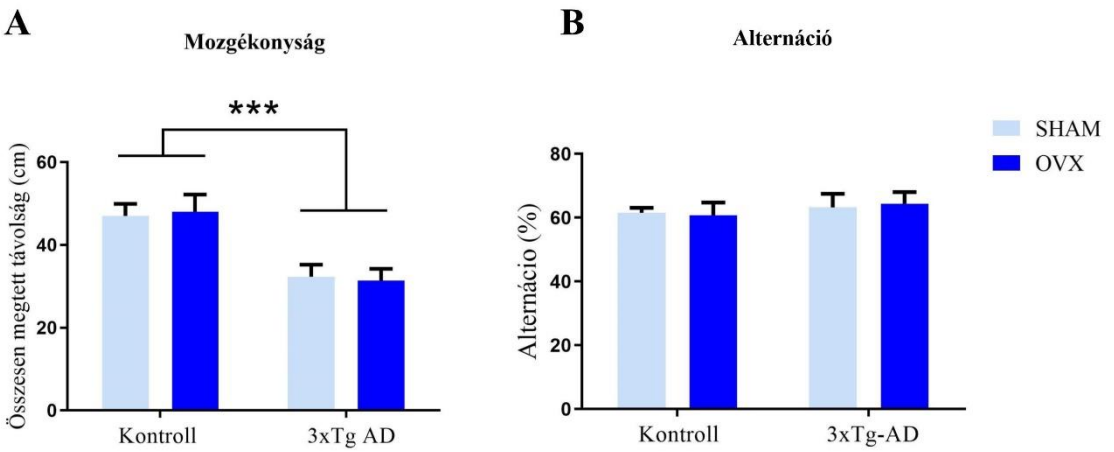
15.

Ábra. Mágneses rezonancia vizsgálatok. A: A kötő- és támasztószövet részaránya a testtömeghez képest (%) csökkent 1 hónappal az OVX után ($p<0,0001$), valamint a 3xTg-AD állatokban a kontrollokhoz képest ($p=0,0016$). B: A testzsír % a 3xTg-AD állatokban magasabb volt, mint a kontrollokban ($p=0,0034$), amit az OVX mindkét genotípusban súlyosbított ($p<0,0001$). C: A testzsír és a kötő- és támasztószövetek arányában negatív és szignifikáns korreláció volt megfigyelhető. C: A különböző állatcsoportok hidratációs állapota normális volt (80% ± 5). Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$.

V.2. Magatartási vizsgálatok

V.2.1. „Y-Maze” (y-labirintus)

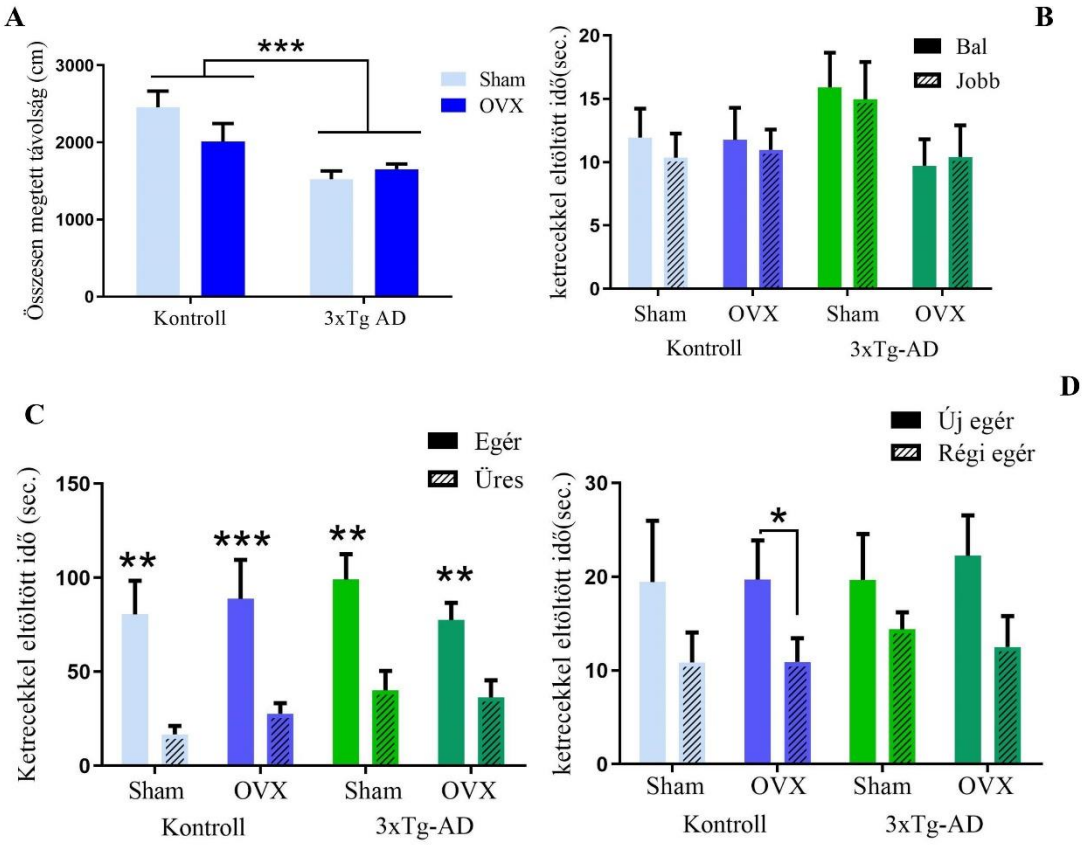
A csoportok között nem figyelhettünk meg különbséget a rövidtávú memória fő paraméterében, az alternációban (16.B Ábra). Ugyanakkor a 3xTg-AD állatok szignifikánsan kevesebbet mozogtak, mint a kontroll állatok [$F_{(1,31)} = 19,52$, $p=0,0001$], az OVX-től függetlenül (16. A Ábra).



16. Ábra: „Y-Maze" (y-labirintus). A: A karokba velő összes belépések száma a megtett távolságot jelzi, mely szignifikánsan kevesebb volt a 3xTg-AD állatok esetén, mint a kontrolloknál (p=0,0001) B: A „helyes" karválasztások százalékos arányában nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. ***$p < 0.001$

V.2.2. „Szociális diszkrimináció" teszt (SD)

A teszt első, OF fázisa során megerősítettük, hogy a 3xTg-AD állatok kevesebbet mozognak [$F_{(1, 32)}$=13.80, p=0.0008] (17.A Ábra). A második fázisban (tárgyhoz való habituáció) egyik állat sem részesítette előnyben egyik oldalt sem: sem a genotípus, sem az OVX nem befolyásolta szignifikánsan a két tárgy vizsgálatát (17.B Ábra). A teszt harmadik fázisában (szociabilítás) minden állat nagyobb érdeklődést mutatott a stimulus állatot tartalmazó ketrec felé, szignifikáns csoportok közötti különbség nélkül [Repeated-measures ANOVA: $F_{(1,32)}$ =33,81, p<0,0001; „singel-sample" t-próba: kontroll-sham: $t_{(7)}$=4,27, p=0,0037; Kontroll-OVX: $t_{(9)}$=5,49 p=0,0004; 3xTg AD-Sham: $t_{(6)}$ =3,50, p=0,0128; 3xTg AD-OVX: $t_{(9)}$ = 3,90, p=0,0036] (17.C Ábra). Az OVX állatok kevesebbszer közelítették meg a stimulus állatot tartalmazó ketrecet, de szignifikáns különbség nem volt [$F_{(1,32)}$ =3,89, p=0,0881]. A vizsgálat negyedik fázisában (szociális diszkrimináció, SD) minden csoport nagyobb érdeklődést mutatott az új egér iránt [$F_{(1,62)}$=7,75 p=0,0071]. Elmondható, hogy az állatok az új, még ismeretlen egeret részesítik előnyben (13.D Ábra). A csoportokat külön-külön vizsgálva csak a kontroll-OVX csoportnál találtunk szignifikáns különbséget a régi és új állat vizsgálatával töltött idő között [Egymintás t-próba: Kontroll-Sham: $t_{(7)}$=1,17, p=0,2806, kontroll-OVX: $t_{(9)}$=2,48, p=0,0348, 3xTg-AD-Sham: $t_{(6)}$=0,53, p=0,6179, 3xTg-AD-OVX: $t_{(9)}$=2,03, p=0,0732].

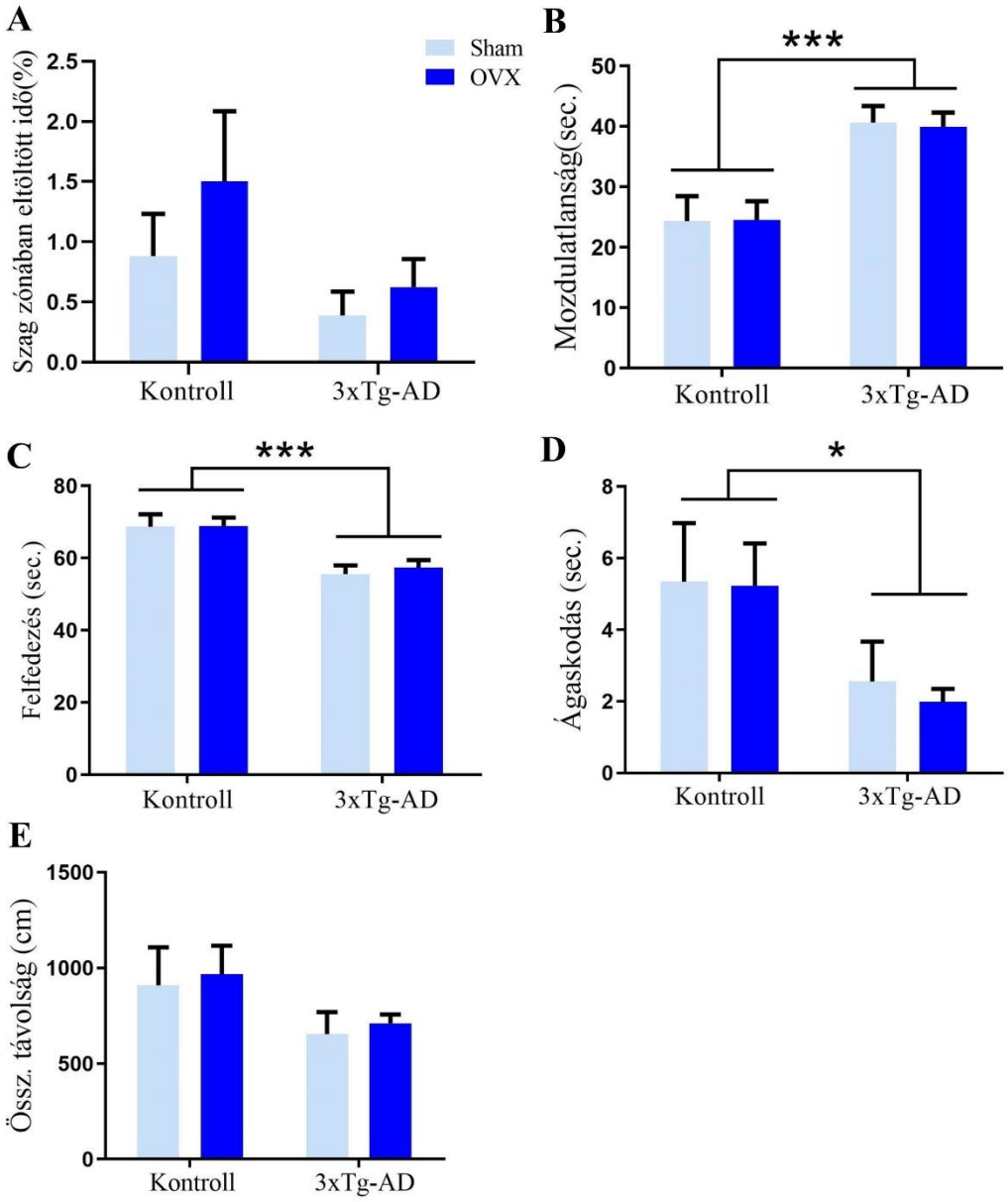


17.

Ábra: Szociális diszkrimináció teszt. A: Nyílt tér, OF. A 3xTg AD csoportban kevesebb mozgási aktivitás volt megfigyelhető a megtett távolságban (p=0,0008). B: Habituáció. Az állatok egyik oldalt sem részesítették előnyben a másikkal szemben. C: Szociabilitás. Minden egér nagyobb érdeklődést mutatott az egeret tartalmazó ketrec felé (p<0,0001); D: Szociális diszkriminancia. Az új egeret tartalmazó ketrec iránt nagyobb volt összességében az érdeklődés (p=0,0071). Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

V.2.3. „Fox odor" (rókaszag) teszt

A genotípusokat összehasonlítva a 3xTg-AD állatok kevesebb időt töltöttek el a szagzónában mint a kontroll állatok [$F_{(1,27)}$=3,51, p=0,0719], és több időt töltöttek mozdulatlanságban (freezing) [$F_{(1,31)}$=25,33, p<0,0001], valamint kevesebb időt ágaskodással [$F_{(1,31)}$=7,15, p=0,0118], és felfedezéssel [$F_{(1,31)}$=22,48, p<0,0001] (18. Ábra).. A genotípusok között különbség figyelhető meg a mozgási aktivitásban is, ezeket az adatokat a megtett távolságban fejeztük ki [$F_{(1,31)}$=3,46, p=0,0723]. Az egyéb tevékenységek (mosakodás, szimatolás) nem térnek el a csoportok között így ezeket az adatokat nem tüntettük fel. A kapott értékek alapján megállapíthatjuk, hogy az OVX nem volt jelentős hatással az adott viselkedési tesztre.



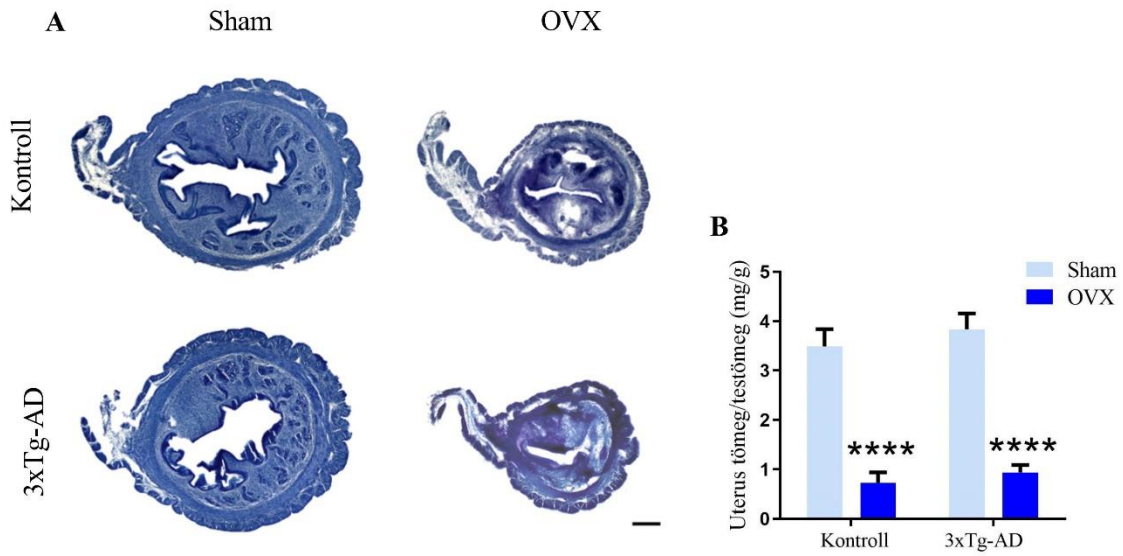
18.

Ábra: „Fox odor" (rókaszag) teszt. A: szagzónában eltöltött időben (sec.) nem volt különbség a genotípus és a műtéti csoportok között sem. B: A 3xTg AD egerek több időt töltöttek mozdulatlanságban, mint a kontroll csoport ($p<0,0001$). C: A 3xTg AD állatok a kontrollhoz képest kevesebb időt töltöttek felfedezéssel ($p<0,0001$). D: A3xTg-AD állatok kevesebb időt töltöttek ágaskodással, mint a kontrollok ($p=0,0118$). E: Összes megtett távolság (cm). A 3xTg AD egerek kevesebbet mozogtak a kontrollhoz képest ($p=0,0723$). Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$.

V.3. Morfológiai vizsgálatok

V.3.1. Hematoxilin-eozin festés

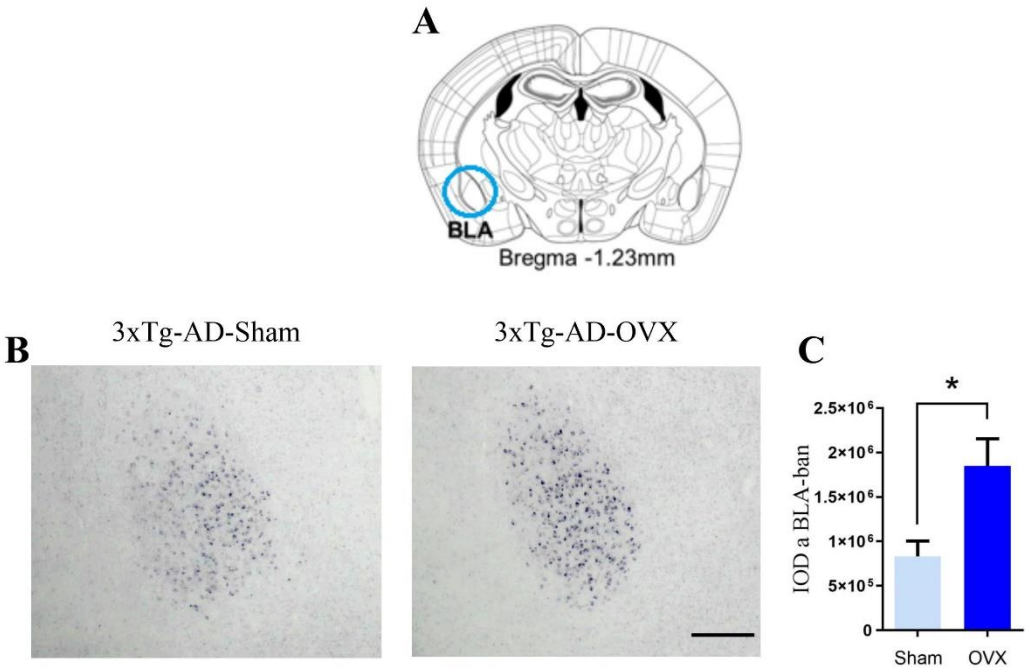
Az OVX-en átesett állatok uterusza elsorvadt, csökkent a méh mérete és a lumen átmérő, emellett csökkent a hámréteg vastagság, és az endometrium mirigyezetsége is (19.A Ábra). A genotípusnak nem volt hatása ezekre a változásokra. Hasonlóan, genotípustól függetlenül mind a kontroll, mind a 3xTg-AD csoportban az uterusz súlya szignifikánsan alacsonyabb volt az OVX után, mint a Sham csoportban [$F_{(1,31)}$= 121,80, $p<0,0001$] (15.B Ábra).



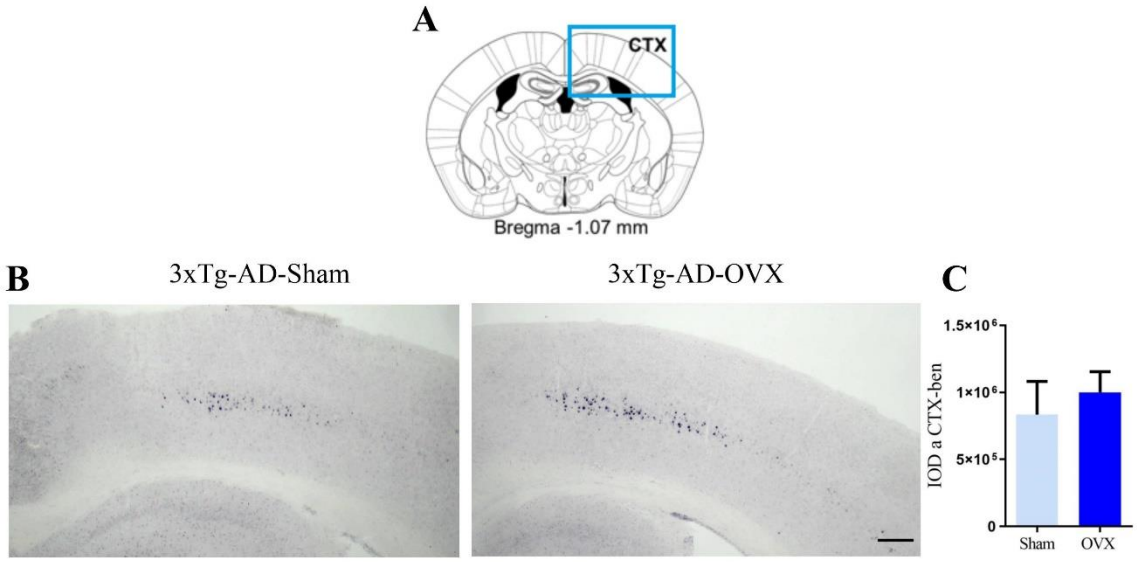
19. Ábra: Az uterusz hematoxilin-eozin festése 2 hónappal a Sham és OVX műtétek után. A: A mintákon látható a hámréteg vastagságának a csökkenése és az endometrium mirigyezettségének a csökkenése OVX következtében. B: Az uterusz súlya az állatok testtömegére normalizálva. Az OVX műtét után szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető ($p<0,0001$) genotípus különbségek nélkül. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. ****$p < 0.0001$.

V.3.2. β-amiloid felhalmozódás a különböző agyi területeken

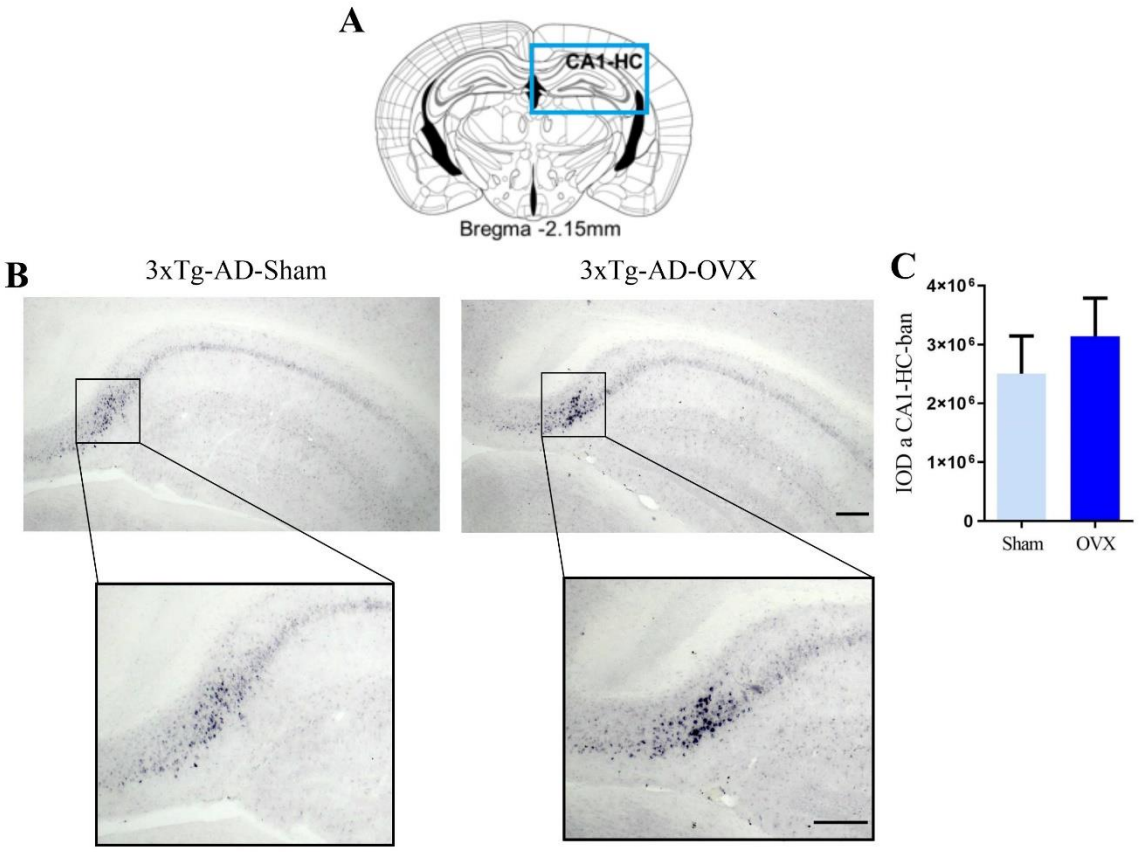
A β-amiloid felhalmozódást csak a 3xTg-AD genotípusú állatokban határoztuk meg. A kontroll állatok agyában nem volt kimutatható Aβ lerakódás, ezért a 3xTg-AD csoportot (kontroll) hasonlítottuk a 3xTg-AD-OVX csoporthoz. A 3xTg-AD-OVX állatok esetén a basolaterális amigdala (BLA) területén szignifikánsan több β-amiloid plakk felhalmozódás volt, mint a 3xTg-AD-Sham csoportban [$t_{(9)}$= 2,72, p=0,0236] (20.Ábra). A szomatoszenzoros kéregben (CTX) és a hippokampusz CA1 (CA1-HC) régióban az OVX-nek nem volt szignifikáns hatása a lerakódásokra (21 és 22. Ábra).



20. Ábra.: A Aβ plakkok immunhisztokémiai festése (NiDAB) a (A) Basolaterális amygdala (BLA) Bregma -1,23 mm (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4. kiadása). B: Aβ lerakódások a BLA régióban a 3xTg-AD-Sham és 3xTg-AD-OVX csoportokban. C: A Aβ plakkok integrált optikai sűrűsége (IOD) a BLA területén az OVX után szignifikánsan nagyobb volt (p=0,0236). Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. *$p < 0.05$.



21. Ábra: Az Aβ plakkok immunhisztokémiai festése (NiDAB) a (A) Motoros- és szomatoszenzoros kéregben (CTX) Bregma -1,07 mm (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4. kiadása). (B): Aβ plakkok a CTX területén 3xTg-AD-Sham és 3xTg-AD-OVX csoportban. (C): Az Aβ plakkok IOD-a a CTX-ben mérve, nem volt szignifikáns különbség. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve.



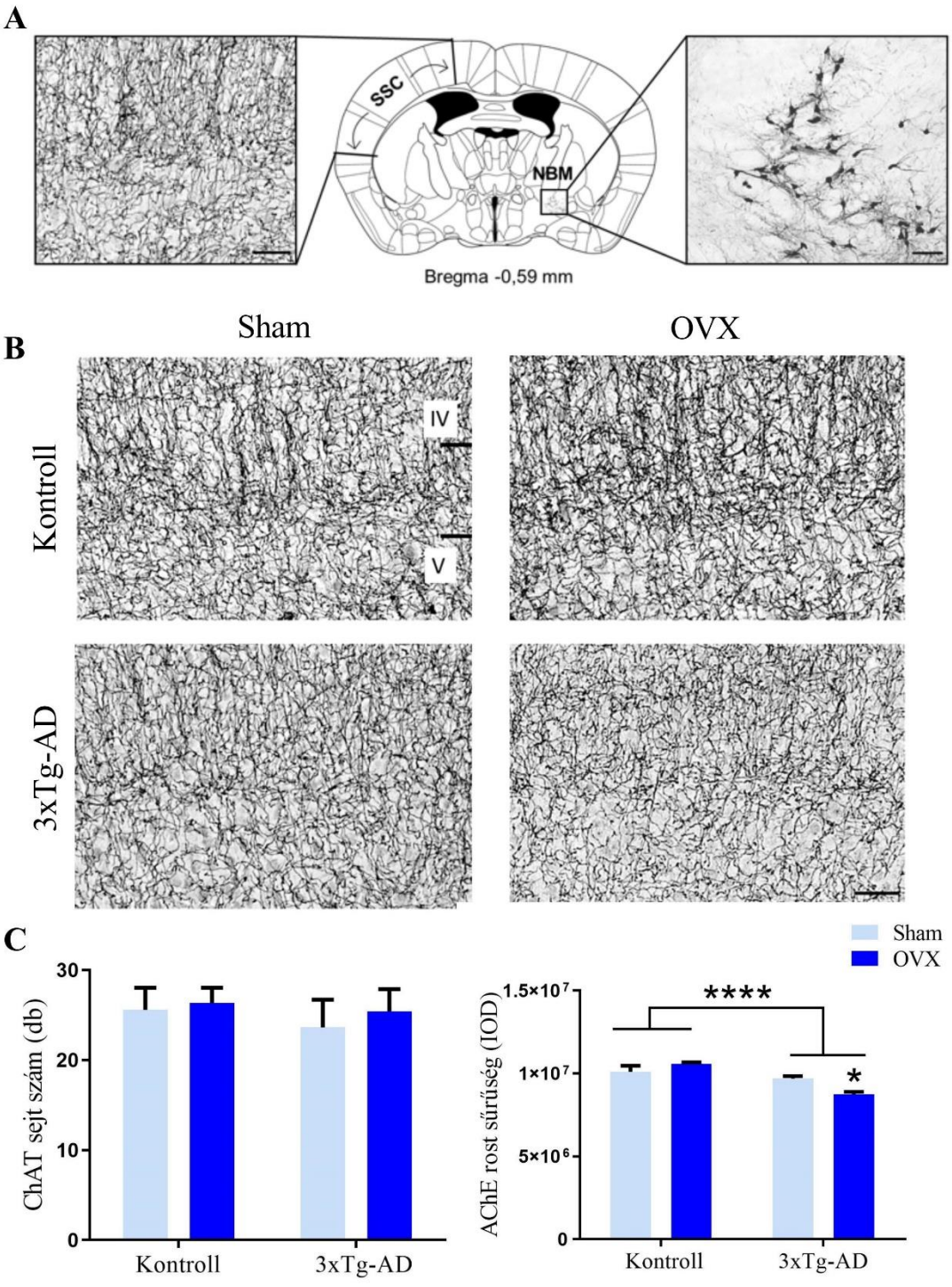
22. Ábra: Az Aβ plakkok immunhisztokémiai festése (NiDAB) a (A) hippokampusz CA1 régiójában (CA1-HC), Bregma -2,15 mm (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4.kiadása). (B): Aβ plakkok a CA1-HC területén 3xTg-AD-Sham és 3xTg-AD-OVX csoportban (C) A Aβ plakkok IODa a CA1-HC-ben mérve, nem volt szignifikáns különbség. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve.

V.3.3. Morfológiai vizsgálatok a kolinerg rendszerben

A ChAT pozitív sejteket leszámoltuk a nucleus basalis magnocellularis (NBM) régióban, míg az AChE rostdenzitást a szomatoszenzoros kéregben néztük (23.A Ábra).

A sejtek számában nem találtunk különbséget a 3xTg-AD és a kontroll állatok között, ahogy az OVX és a Sham csoportok között sem (23.C Ábra).

Ezzel szemben a 3xTg-AD csoportban az AChE rostok sűrűsége szignifikánsan csökkent [$F_{(1,22)}$= 29,49, p<0,0001] (19. B és D Ábra). A genotípus és az OVX között szignifikáns interakció volt megfigyelhető [$F_{(1,22)}$=11,60, p=0,0025]. A 3xTg-AD genotípusban az OVX növelte a rostveszteséget a Sham csoporthoz képest [p=0,0147].



23.

Ábra: A kolinerg sejttestek és rostjaik immunhisztokémiai festésének eredményei. (A): A Nucleus basalis magnocelluláris (NBM) területén található kolin-acetil-transzferáz (ChAT) pozitív neuronok és acetilkolinészteráz (AChE) pozitív rostjainak elhelyezkedése a szomatoszenzoros kéregben (SSC), Bregma -0,59 mm (kép: Paxinos Mouse Brain atlas 4. kiadása). (B) AChE-pozitív rostok az SSC IV és V rétegben. (C): ChAT- pozitív sejtek száma az NBM régióban (NiDAB-os immunhisztokémiával jelölve), a csoportok között nem volt szignifikáns különbség. (D): AChE-pozitív rost sűrűség IOD-ben kifejezve. A 3xTg-AD egerek AChE rostsűrűsége alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest ($p<0,0001$). Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. ****$p < 0.0001$.

VI. Következtetések

A hipotézisünk az volt, hogy az OVX meggyorsítja az AD-re jellemző magatartási és morfológiai tünetek kialakulását 3xTg-AD egérmodellben. Ezzel ellentétben az OVX nem súlyosbította az AD-re jellemző tüneteket a magatartási vizsgálatokban. Azonban a morfológiai vizsgálatokban megfigyelhetők voltak a neurodegeneráció jelei a BLA területén Aβ felhalmozódásban, és az SSC-ben mért rostsűrűség csökkenésben.

Mindenesetre megerősítettük az OVX egérmodell működését. az MRI vizsgálatok alátámasztották, hogy a műtét hatására az állatoknak növekedett a testzsír felhalmozódásuk, valamint csökkent a kötő- és támasztószövet arány. A szövettani vizsgálatok bizonyították az uterusz tömegének csökkenését és sorvadását, ami az ösztrogén hiánnyal magyarázható. A szteroid hormon csökkenés növeli az elhízást kockázatát humán esetben is (Mauvais-Jarvis, 2011). Fontos megemlíteni hogy az elhízás is növeli az AD kialakulásának kockázatát (Picone et al., 2020), így az OVX még inkább hatással lehet a betegség kialakulására. Az MRI vizsgálatok során láthattuk, hogy a kötő- és 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), ugyanis a csontokban is expresszálódnak ösztrogén receptorok, amik elősegítik a csontszerkezetek védelmét (Liedert et al., 2020).

A demencia egyik fő tünete a kognitív funkciók romlása. Ezt a hanyatlást memória tesztek segítségével vizsgáltunk. Irodalmi adatok alapján a memória vesztés a 3xTg-AD állatmodell esetében 6 hónapos korban jelentkezik (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). A kísérleteinket 4-5 hónapos állatokon végeztük, ezért nem figyelhettünk meg szignifikáns különbséget a magatartási vizsgálatokban. A hipotézisünket nem sikerült bizonyítani, miszerint az OVX súlyosbítja a kognitív funkciók romlását 6 hónapnál fiatalabb állatok esetében is, mivel az OVX-nek egyik magatartási vizsgálatban sem volt szignifikáns hatása. Az állatok épp memóriája azzal is magyarázható, hogy a hippokampuszban és a kérgi területeken nem sikerült kimutatni szignifikáns különbséget a Aβ lerakódások esetében.

A menopauzán átesett nők és az AD egyik jellemző tünete a depresszió és a szorongás (Siegel & Mathews, 2015). Mivel mind az AD, mind az OVX növeli a szorongást, így feltételeztük, hogy az állatmodellünk esetén szignifikáns különbséget fogunk tapasztalni a szorongást vizsgáló teszt esetén. A „Fox odor” (rókaszag) tesztben egyedül csak az AD hatása volt megfigyelhető, 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. Ezek az eredmények összefügghetnek BLA területén megfigyelt Aβ felhalmozódással. Ez az agyi terület felelős a félelemmel kapcsolatos válaszok kialakításáért (Adhikari et al., 2015). A viselkedési tesztekben a mozgási aktivitás csökkent, ami szintén szorongásos viselkedésre utal. Ez a csökkenés összefüggésbe hozható a motoros- és szomatoszenzoros kéreg Aβ felhalmozódással. Az OVX nem volt hatással a mozgékonyságra.

A morfológiai elváltozások - a viselkedés vizsgálatokkal szemben - már a korábbi hónapokban is kimutathatók. Az AD-re jellemző Aβ plakkok csak a 3xTg-AD állatoknál jelentek meg. Az OVX hatása is megfigyelhető volt, növelte az amiloid plakkok számát a 3xTg-AD állatokban. Fiatal egerekben csak a BLA-ban volt szignifikáns különbség, ez a terület érzékenyebb lehet, ahol a változások korábban jelentkeznek. A BLA területén az ösztradiol (E2) csökkenti az ingerlékenységét (Rodrigues & Sapolsky, 2009). Így az OVX hatására csökkenő E2 szint elősegítette a Aβ felhalmozódást.

Az AD-ban különösen érintett kolinerg rendszerben vizsgáltuk a NBM területén a sejtszámot, és ezeknek a sejteknek a projekcióját az SSC-ben. A ChAT-pozitív sejtszámot tekintve nem találtunk szignifikáns különbséget az 5 hónapos állatainkban. Korábbi vizsgálatokban is az E2 nem hatott a kolinerg sejtszámra, hanem a rostdenzitást befolyásolta (Koszegi & Abraham, 2012; Koszegi et al., 2011). Esetünkben is az SSC-ben megfigyelhető volt a AChE-pozitív rostok degenerációja 3xTg-AD állatokban, amit az OVX súlyosbított. Ez arra utal, hogy az axonális degeneráció előbb indul meg, mint a NBM területén a sejtszám csökkenés.

Kísérleteink eredményét befolyásolhatta a fitoösztrogén, mivel hagyományos étrendet alkalmaztunk. Valamint a felhasznált állatok számának csökkentetése érdekében ismételt tesztelést alkalmaztunk. Több olyan magatartási vizsgálatot is végeztünk, amelyek nagyobb állatszámmal pontosabb eredményeket kaphattunk volna (pl.: „Szociális diszkrimináció” teszt).

Mindenesetre összefoglalva megerősítettük, hogy az OVX-el előidézett menopauzás tünetek növelik az AD-re jellemző szövettani elváltozásokat az agyban, anélkül, hogy ez hatással lenne a magatartási tesztekre. A fiatal, 3-5 hónapos 3xTg-AD-OVX állatmodell hatásos lehet a betegség morfológiai vizsgálatára és felgyorsíthatja a kezelések kidolgozását, mivel nem kell várni az állatok öregedésére (6-12 hónapot), azonban a magatartási vizsgálatokban a tünetek kialakulásához több időre lenne szükség (3-5 hónapos korban a tünetek még nem jelentkeztek).

VII. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zelena Dórának a lehetőséget, hogy a kutatócsoportjában írhattam a szakdolgozatomat. Mindig rendelkezésemre álló szakmai támogatása, építő kritikái és ötletei nélkül ez a szakdolgozat nem jöhetett volna létre. Köszönettel tartozom Farkas Szidónia PhD hallgatónak a türelméért és idejéért amelyet rám fordított, valamint hogy végig figyelemmel kísérte a munkámat és a dolgozatom elkészülését. Emellett köszönettel tartozom az Általános Orvostudományi Kar Élettani Intézet minden tagjának és Magatartásélettan és Sressz Kutatócsoport munkatársainak, aki segítette a munkámat. Végül de nem utolsó sorban köszönettel tartozom belső konzulensemnek Dr. Hernádi Istvánnak.

VIII. Rövidítésijegyzék

3xTg-AD	Háromszoros transzgén egér
Aβ	Amiloid béta
ACh	Acetilkolin
AChE	Acetilkolin észteráz
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekurzor protein
AD	Alzheimer-kór
BLA	Basolaterális amygdala
CA1-HC	Hippokampusz CA1 régió
ChAT	Kolin acetil transzferáz
CTX	Szomatomotoros kéreg
DI	Diszkriminancia index
E2	Ösztradiol
MAPT	Mikrotubulus-asszociált protein tau
NBM	Nucleus basalis magnocellularis

OF	Nyitott tér (Open field)
OXV	Ovariektómia, a petefészkek eltávolítása
PET	Pozitron emissziós tomográf
SD	Szociális diszkriminancia teszt

IX Hivatkozott irodalmak jegyzéke

2020 Alzheimer's disease facts and figures. (2020). *Alzheimers Dement*. https://doi.org/10.1002/alz.12068

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. https://doi.org/10.1038/nature15698

Ahmed, T. F., Ahmed, A., & Imtiaz, F. (2021). History in perspective: How Alzheimer's Disease came to be where it is? *Brain Res*, *1758*, 147342. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147342

Arnold, S., & Beyer, C. (2009). Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. *J Neurochem*, *110*(1), 1-11. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06133.x

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. https://doi.org/10.1111/acel.12873

Brotfain, E., Gruenbaum, S. E., Boyko, M., Kutz, R., Zlotnik, A., & Klein, M. (2016). Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *Curr Neuropharmacol*, *14*(6), 641-653. https://doi.org/10.2174/1570159x14666160309123554

Cacace, R., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*, *12*(6), 733-748. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012

Chaves, T., Torok, B., Fazekas, C. L., Correia, P., Sipos, E., Varkonyi, D., Hellinger, A., Erk, D., & Zelena, D. (2022). Median raphe region GABAergic neurons contribute to social interest in mouse. *Life Sci*, *289*, 120223. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120223

Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, *219*(4589), 1184-1190. https://doi.org/10.1126/science.6338589

Farkas, S., Szabo, A., Hegyi, A. E., Torok, B., Fazekas, C. L., Ernszt, D., Kovacs, T., & Zelena, D. (2022). Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions. *Biomedicines*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/biomedicines10040861

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*, *14*(1), 101-115. https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726

Fonyó Attila, L. E., Mitsányi Attila, Szűcs Géza, Balla Tamás. (2011). *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina.

Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*, *116*, 135-170. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001

Garg, D., Ng, S. S. M., Baig, K. M., Driggers, P., & Segars, J. (2017). Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol Metab*, *28*(9), 656-668. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.006

Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., & Crowther, R. A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, *8*(1), 159-168. https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90117-v

Granholm, A. C. (2000). Oestrogen and nerve growth factor - neuroprotection and repair in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, *9*(4), 685-694. https://doi.org/10.1517/13543784.9.4.685

Guennoun, R. (2020). Progesterone in the Brain: Hormone, Neurosteroid and Neuroprotectant. *Int J Mol Sci*, *21*(15). https://doi.org/10.3390/ijms21155271

Guo, Y., Wang, Q., Chen, S., & Xu, C. (2021). Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. *Metabolism*, *115*, 154454. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154454

Hori, Y., Hashimoto, T., Nomoto, H., Hyman, B. T., & Iwatsubo, T. (2015). Role of Apolipoprotein E in beta-Amyloidogenesis: ISOFORM-SPECIFIC EFFECTS ON PROTOFIBRIL TO FIBRIL CONVERSION OF Abeta IN VITRO AND BRAIN Abeta DEPOSITION IN VIVO. *J Biol Chem*, *290*(24), 15163-15174. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622209

John E. Hall, M. E. H. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier.

Koszegi, Z., & Abraham, I. M. (2012). Effect of ageing on post-lesion oestradiol treatment on mouse cholinergic neurones in vivo. *J Neuroendocrinol*, *24*(9), 1243-1248. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02331.x

Koszegi, Z., Szego, E. M., Cheong, R. Y., Tolod-Kemp, E., & Abraham, 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. https://doi.org/10.1210/en.2011-1017

Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, *138*(3), 863-870. https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4979

LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*, *11*(4), 170-176. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.009

Liedert, A., Nemitz, C., Haffner-Luntzer, M., Schick, F., Jakob, F., & Ignatius, A. (2020). Effects of Estrogen Receptor and Wnt Signaling Activation on Mechanically Induced Bone Formation in a Mouse Model of Postmenopausal Bone Loss. *Int J Mol Sci*, *21*(21). https://doi.org/10.3390/ijms21218301

Lu, C. L., & Herndon, C. (2017). New roles for neuronal estrogen receptors. *Neurogastroenterol Motil*, *29*(7). https://doi.org/10.1111/nmo.13121

Lyketsos, C. G., Carrillo, M. C., Ryan, J. M., Khachaturian, A. S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., & Miller, D. S. (2011). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *7*(5), 532-539. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2410

Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*, *7*(8), 497-508. https://doi.org/10.2174/138920206779315737

Mauvais-Jarvis, F. (2011). Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol Metab*, *22*(1), 24-33. https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.002

Metherall, J. E., Waugh, K., & Li, H. (1996). Progesterone inhibits cholesterol biosynthesis in cultured cells. Accumulation of cholesterol precursors. *J Biol Chem*, *271*(5), 2627-2633. https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2627

Nalvarte, I., Varshney, M., Inzunza, J., & Gustafsson, J. A. (2021). Estrogen receptor beta and neural development. *Vitam Horm*, *116*, 313-326. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2021.02.007

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *24*(8), 1063-1070. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, 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. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00434-3

Pairojana, T., Phasuk, S., Suresh, P., Huang, S. P., Pakaprot, N., Chompoopong, S., Hsieh, T. C., & Liu, I. Y. (2021). Age and gender differences for the behavioral phenotypes of 3xTg alzheimer's disease mice. *Brain Res*, *1762*, 147437. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147437

Picone, P., Di Carlo, M., & Nuzzo, D. (2020). Obesity and Alzheimer's disease: Molecular bases. *Eur J Neurosci*, *52*(8), 3944-3950. https://doi.org/10.1111/ejn.14758

Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, *95*(1-2), 671-680. https://doi.org/10.1002/jnr.23827

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, *362*(4), 329-344. https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142

Quispe Calla, N. E., Vicetti Miguel, R. D., Aceves, K. M., Huang, H., Howitt, B., & Cherpes, T. L. (2021). Ovariectomized mice and postmenopausal women exhibit analogous loss of genital epithelial integrity. *Tissue Barriers*, *9*(2), 1865760. https://doi.org/10.1080/21688370.2020.1865760

Riedel, B. C., Thompson, P. M., & Brinton, R. D. (2016). Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *160*, 134-147. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.012

Rodrigues, S. M., & Sapolsky, R. M. (2009). Disruption of fear memory through dual-hormone gene therapy. *Biol Psychiatry*, *65*(5), 441-444. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.09.003

Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R. S., Diaz Brinton, R., & Mosconi, L. (2018). Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J Prev Alzheimers Dis*, *5*(4), 225-230. https://doi.org/10.14283/jpad.2018.34

Schmitz, T. W., Nathan Spreng, R., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2016). Basal forebrain degeneration precedes and predicts the cortical spread of Alzheimer's pathology. *Nat Commun*, *7*, 13249. https://doi.org/10.1038/ncomms13249

Shoham, Z., & Schachter, M. (1996). Estrogen biosynthesis--regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril*, *65*(4), 687-701. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58197-7

Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, *388*(4), 507-525. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971201)388:4<507::aid-cne1>3.0.co;2-6

Siegel, A. M., & Mathews, S. B. (2015). Diagnosis and Treatment of Anxiety in the Aging Woman. *Curr Psychiatry Rep*, *17*(12), 93. https://doi.org/10.1007/s11920-015-0636-3

Singh, M. (2006). Progesterone-induced neuroprotection. *Endocrine*, *29*(2), 271-274. https://doi.org/10.1385/ENDO:29:2:271

Singh, M., & Su, C. (2013). Progesterone and neuroprotection. *Horm Behav*, *63*(2), 284-290. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.06.003

Terzo, S., Amato, A., & Mule, F. (2021). From obesity to Alzheimer's disease through insulin resistance. *J Diabetes Complications*, *35*(11), 108026. https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.108026

Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F., & Giguere, V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, *11*(3), 353-365. https://doi.org/10.1210/mend.11.3.9902

Wang, L., Andersson, S., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2002). Estrogen actions in the brain. *Sci STKE*, *2002*(138), pe29. https://doi.org/10.1126/stke.2002.138.pe29

Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., & Delon, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, *215*(4537), 1237-1239. https://doi.org/10.1126/science.7058341

Wu, D., Gao, D., Yu, H., Pi, G., Xiong, R., Lei, H., Wang, X., Liu, E., Ye, J., Yu, H., Gao, Y., He, T., Jiang, T., Sun, F., Su, J., Song, G., Peng, W., Yang, Y., & Wang, J. Z. (2021). Medial septum tau accumulation induces spatial memory deficit via disrupting medial septum-hippocampus cholinergic pathway. *Clin Transl Med*, *11*(6), e428. https://doi.org/10.1002/ctm2.428

Wu, G. Y., & Wu, C. H. (1988). Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry*, *27*(3), 887-892. https://doi.org/10.1021/bi00403a008

Zhang, K., Mizuma, H., Zhang, X., Takahashi, K., Jin, C., Song, F., Gao, Y., Kanayama, Y., Wu, Y., Li, Y., Ma, L., Tian, M., Zhang, H., & Watanabe, Y. (2021). PET imaging of neural activity, beta-amyloid, and tau in normal brain aging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, *48*(12), 3859-3871. https://doi.org/10.1007/s00259-021-05230-5