

# Вплив біциклолу на когнітивні порушення та апоптоз нейронів при хворобі Альцгеймера: роль сигнального шляху Nrf2/НО-1 у пригніченні оксидативного стресу

Сюе Лі · Я Гао · Сянцзянь Чжан · Цзядун Лан · Сян Лю · Ідань Чжан · Цзянь Чжан · Юань Чжао · Цуй Чан · Сюань Гао · Цзінь Чжоу · Дунхуа Юй · Гофен Ян

Надійшла до редакції: 21 липня 2025 р.

Прийнята до друку: 20 жовтня 2025 р.

© Автор(и), на умовах виключної ліцензії для Springer Science+Business Media, частини Springer Nature, 2025 р.

## Анотація

Хвороба Альцгеймера (ХА) визнана найпоширенішим нейродегенеративним захворюванням у світі, яке зрештою призводить до деменції. Наразі механізми, що сприяють розвитку ХА, залишаються недостатньо вивченими, а кількість доступних терапевтичних альтернатив є обмеженою. Біциклом — речовина, екстрагована з китайської лікарської рослини *Schisandra chinensis* (лимонник китайський), — продемонстрував виражені антиоксидантні, протизапальні, антиапоптотичні та нейропротекторні властивості. Проте наразі бракує досліджень, зосереджених на терапевтичному впливі біциклолу при ХА, а також на молекулярних шляхах, які можуть бути до цього залучені.

Метою цього дослідження було оцінити вплив біциклолу на когнітивні порушення у мишачій моделі ХА, дослідити його нейропротекторні переваги, пов'язані з антиоксидантними функціями та пригніченням апоптозу, а також визначити залучені механізми. У цьому дослідженні миші лінії APP/PS1 проходили 2-місячне лікування біциклолом, який вводили через зонд, після чого їхні когнітивні здібності оцінювали за допомогою поведінкових тестів. Апоптоз кортикальних нейронів оцінювали з використанням методу TUNEL-фарбування та методів імунофлуоресценції. Клітини N2A, піддані впливу олігомерів A $\beta$ 1–42, проходили попередню обробку біциклолом, після чого визначали їхню життєздатність.

Рівні експресії білків, таких як ядерний фактор 2, пов'язаний з еритроїдним фактором 2 (Nrf2), гемоксигеназа-1 (НО-1), NAD(P)H-хінон-оксидоредуктаза-1 (NQO1), BAX-білок (Bax), лімфома В-клітин-2 (Bcl-2) та розщеплена каспаза-3, були кількісно визначені *in vitro* (у пробірці) та *in vivo* (на живому організмі) методами вестерн-блотингу та кПЛР. Крім того, клітини N2A з дефіцитом Nrf2 використовувалися для дослідження фундаментальних механізмів, за допомогою яких біциклом чинить свій вплив при хворобі Альцгеймера.

Було показано, що біциклом покращує когнітивну функцію, одночасно знижуючи рівні коркових A $\beta$ 1–40 та A $\beta$ 1–42, а також захищає від нейрональної дегенерації в мишачій моделі APP/PS1. Крім того, він підвищує активність коркових SOD (супероксиддисмутази) та GSH-Px

(глутатіонпероксидази), одночасно знижуючи рівні ROS (активних форм кисню) та MDA (малонового діальдегіду) *in vivo*.

Додатково біциклол значно зменшив оксидативний стрес та апоптоз, індуковані A $\beta$ 1–42 у клітинах N2A. Він також підвищив експресію таких білків, як Nrf2, HO-1 та NQO1, поряд із рівнями мРНК як в експериментах *in vitro*, так і *in vivo*. Більше того, «вимкнення» (сайленсинг) Nrf2 шляхом трансфекції сіРНК протидіяло регуляторним ефектам біциклолу на маркери апоптозу, включаючи Bax, Bcl-2 та розщеплену каспазу-3 *in vitro*.

Наше дослідження надає переконливі докази того, що біциклол ефективно полегшує когнітивні порушення, які спостерігаються у мишей APP/PS1. Крім того, наші результати вказують на те, що біциклол відіграє значну роль у зниженні ушкоджень, спричинених оксидативним стресом, та апоптозу нейронів. Цей захисний ефект пов'язаний з активацією сигнального шляху Nrf2/HO-1. Ці результати припускають, що біциклол має потенціал для розробки як терапевтичний агент для лікування хвороби Альцгеймера, підкреслюючи його перспективність у вирішенні проблеми когнітивного зниження, пов'язаного з цим виснажливим станом.

**Ключові слова:** Хвороба Альцгеймера · Біциклол · Оксидативний стрес · Апоптоз · Nrf2/HO-1

**Посилання для цитування:** Li S, Gao Y, Zhang X, Lang J, Liu X, Zhang Y, Zhang J, Zhao Y, Chang C, Gao X, Zhou J, Yu D, Yang G. Bicyclol improves cognition deficits and inhibits oxidative stress-induced neuronal cell apoptosis in Alzheimer's disease via Nrf2/HO-1 pathway. *Metab Brain Dis.* 2025 Nov 6;40(8):310. doi: 10.1007/s11011-025-01738-z. PMID: 41196440.

## Вступ

Хвороба Альцгеймера (ХА) являє собою поширений нейродегенеративний стан, який проявляється насамперед через прогресуюче зниження когнітивних здібностей, помітне погіршення пам'яті, зміни особистості та, зрештою, призводить до значних порушень нормальної соціальної й емоційної поведінки. Дослідження, представлені Jazvinščak Jembrek та співавт., а також Levenson та співавт. (Jazvinščak Jembrek et al. 2015; Levenson et al. 2014), підкреслюють ці критичні симптоми, які не лише впливають на осіб із діагностованим станом, але й мають глибокі наслідки для їхніх опікунів та сімей.

З патологічної точки зору хвороба Альцгеймера характеризується такими процесами, як загибель нейронів, накопичення бляшок амілоїду бета (A $\beta$ ) та гіперфосфорилування тау-білків. Ці основні механізми зумовлюють складну природу захворювання та ілюструють залучені біологічні складнощі. Наразі хвороба Альцгеймера уражає понад 50 мільйонів людей у всьому світі, причому прогнози припускають, що це число може зрости приблизно до 150 мільйонів до 2050 року, як зазначено Jannat та співавт. (Jannat et al. 2019). Це очікуване зростання кількості випадків становить серйозну проблему, накладаючи величезний емоційний та економічний тягар не лише на сім'ї, але й на системи охорони здоров'я та суспільство в цілому. З огляду на складну природу патогенезу захворювання, який залишається недостатньо вивченим, розробка ефективних стратегій управління хворобою Альцгеймера стала важковиконуваним завданням для дослідників у цій галузі, як підкреслюють Park та співавт. (Park et al. 2018). Триваючий пошук рішень потребує узгоджених зусиль наукової спільноти для розкриття складнощів цього поширеного захворювання та, зрештою, покращення якості життя постраждалих.

Оксидативний стрес дедалі частіше визнається ключовим елементом, який відіграє вирішальну роль як в ініціюванні, так і у сприянні прогресуванню хвороби Альцгеймера (ХА). Цей стан виникає, коли спостерігається дисбаланс між генерацією вільних радикалів, які насамперед відомі як активні форми кисню (АФК/ROS), та здатністю організму нейтралізувати ці шкідливі агенти за допомогою своїх антиоксидантних захисних механізмів. Оксидативне ушкодження, що виникає внаслідок цього, може призвести до ушкодження нейронів, змін у клітинних шляхах та, зрештою, до когнітивного зниження, пов'язаного із захворюванням. Таким чином, розуміння оксидативного стресу та його наслідків при ХА є життєво важливим для розробки ефективних терапевтичних стратегій, спрямованих на пом'якшення його шкідливих ефектів.

У здоровому фізіологічному середовищі низькі концентрації АФК зазвичай не є шкідливими. Це пов'язано з існуванням тонкої рівноваги між прооксидантами, які можуть призводити до оксидативного ушкодження, та антиоксидантами, які допомагають нейтралізувати ці потенційно шкідливі речовини, тим самим підтримуючи здоров'я клітин. Однак оксидативний стрес проявляється, коли АФК порушують клітинні антиоксидантні функції, переважно призводячи до загибелі нейронів через апоптоз (Jazvinščak Jembrek et al. 2015), що сприяє прогресуванню ХА (Cassamo et al. 2017; Wan et al. 2019).

Свідчення апоптозу нейронів спостерігалися на ранніх стадіях ХА, при цьому значна кількість апоптотичних нейронів була виявлена в гіпокампі та корі головного мозку під час розтину осіб із діагнозом ХА (Shao et al. 2020). Ці дані вказують на зв'язок між оксидативним стресом, індукованим амілоїдом-бета (А $\beta$ ), та апоптозом нейронів. Було показано, що накопичення А $\beta$  підвищує утворення АФК (активних форм кисню), знижує рівні Bcl-2, сприяє вивільненню цитохрому С та активує каспазу-3 — усі ці процеси можуть запускати апоптоз (Cheignon et al. 2018; Ju et al. 2005). Отже, взаємодія між оксидативним стресом, апоптозом нейронів та  $\beta$ -амілоїдом викликала значний інтерес для розробки нових терапевтичних стратегій.

Ядерний фактор, пов'язаний з еритроїдним фактором 2 (Nrf2), функціонує як найважливіший транскрипційний фактор, який підвищує стійкість клітин до оксидативного стресу, як зазначили Sies та співавт. (Sies et al. 2017). При активації Nrf2 вивільняється зі свого інгібітора — Kelch-подібного ECH-асоційованого білка 1 (Keap1). Це вивільнення дозволяє Nrf2 мігрувати з цитоплазми до ядра, де він відіграє значну роль в ініціюванні транскрипції різних генів-мішеней downstream. Ці гени-мішені включають гемоксигеназу-1 (HO-1), каталітичну субодиницю глутамат-цистеїнлігази (GCLC) та NAD(P)H-хінооксидоредуктазу-1 (NQO1). Кожен із цих генів кодує критично важливі білки, такі як антиоксидантні ферменти, фактори детоксикації, антиапоптотичні білки та транспортери лікарських засобів, які беруть участь у механізмах клітинного захисту, спрямованих на боротьбу з оксидативним стресом (Morrone et al. 2018; Osama et al. 2020).

На додаток до цієї захисної ролі, Nrf2 також важливий для управління адаптивними реакціями на різні ендогенні та екзогенні стресори. Він відіграє важливу роль у нейтралізації активних форм кисню (АФК) і тим самим допомагає відновити окисно-відновний (редокс) баланс усередині клітин, як викладено Kensler та співавт. (Kensler et al. 2007). Зростаючий обсяг даних вказує на критичну залученість дисфункції Nrf2 у розвиток когнітивних порушень, включаючи хворобу Альцгеймера (ХА). Дослідження продемонстрували зниження рівнів Nrf2 поряд із ключовими антиоксидантними ферментами, такими як супероксиддисмутаза-1 (SOD1), каталаза (CAT) та глутатіонпероксидаза (GSH-Px), у мозку пацієнтів із діагнозом ХА (Mota et al.

2015; Ramsey et al. 2007). Ці результати підкреслюють потенційний взаємозв'язок між порушенням сигналізації Nrf2 та нейродегенеративними процесами, характерними для когнітивного зниження. Крім того, було виявлено, що експресія Nrf2 та його нижчерозташованих генів (NQO1, HO-1 та GCLC) знижена у мозку літніх людей і пацієнтів із ХА (Silva-Palacios et al. 2018). Аналогічним чином, Branca та співавт. провели дослідження на моделях мишей APP/PS1, виявивши, що відсутність Nrf2 значно посилює когнітивний дефіцит, особливо в ділянках, пов'язаних із просторовим навчанням і пам'яттю (Branca et al. 2017).

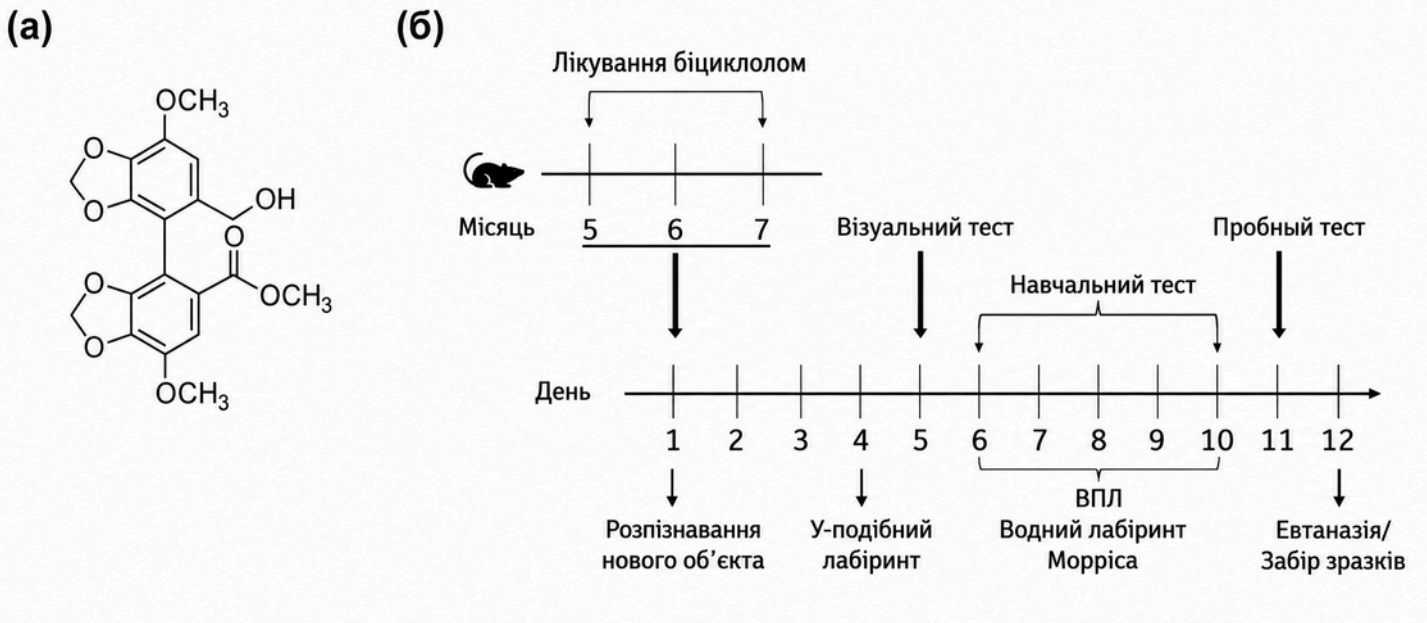
Це відкриття підкреслює згубну роль, яку втрата Nrf2 відіграє у когнітивних функціях на даних моделях хвороби Альцгеймера. Навпаки, інше дослідження, проведене Uruno та співавт., продемонструвало, що активація Nrf2 чинить позитивний вплив на когнітивні здібності у мишачих моделях хвороби Альцгеймера (Uruno et al. 2020). Це покращення приписується здатності Nrf2 пом'якшувати вплив активних форм кисню (АФК) та зменшувати нейрозапалення, обидва з яких є відомими факторами, що сприяють когнітивному зниженню при хворобі Альцгеймера. У сукупності ці результати переконливо вказують на те, що Nrf2 являє собою життєво важливу терапевтичну мішень для лікування хвороби Альцгеймера, припускаючи, що стратегії, спрямовані на посилення активності Nrf2, можуть принести сприятливий ефект у полегшенні когнітивних порушень, пов'язаних із цим станом.

Біциклол, також називаний Віс, являє собою сполуку з хімічною структурою метил 4-[5-(гідроксиметил)-7-метокси-1,3-бензодіоксол-4-іл]-7-метокси-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилат (Рис. 1(а)). Ця сполука синтезується на основі *Schisandra Chinensis* (Лимонника китайського) — рослини, визнаної за свої лікувальні властивості в традиційній китайській медицині.

Біциклол класифікується як новий протигепатитний препарат і набув значного поширення у клінічній практиці по всьому Китаю. Його фармакологічні переваги є широкими та включають механізми антиоксидантної відповіді на стрес і протизапальні ефекти, як задокументовано Zhang та співавт. (Zhang et al. 2014). Нещодавні дослідження підкреслили захисні можливості біциклолу щодо різних органів, схильних до ішемічно-реперфузійного ушкодження. Зокрема, дослідження показують, що біциклол чинить помітну захисну дію на тканини печінки, серця та мозку, про що свідчать дослідження, проведені Zhao та співавт. (Zhao et al. 2020), Cui та співавт. (Cui et al. 2013) і Zhang та співавт. (Zhang et al. 2013, 2014). Крім того, було виявлено, що біциклол чинить сприятливий вплив на здоров'я серцево-судинної системи, проявляючи антиатеросклеротичний ефект, який включає модуляцію мікробіоти кишечника, згідно з результатами Li та співавт. (Li X. L. et al. 2022).

Незважаючи на численні позитивні ефекти, вплив біциклолу на хворобу Альцгеймера та можливі молекулярні механізми його дії дотепер не були вивчені.

У цьому дослідженні автори вивчали потенційні нейропротекторні властивості біциклолу *in vivo* та *in vitro*, а також оцінювали участь шляху Nrf2/HO-1 у реалізації його антиоксидантних та антиапоптотичних ефектів. Це дозволить глибше зрозуміти механізми, за допомогою яких біциклол може забезпечувати нейропротекцію при хворобі Альцгеймера.



**Рис. 1.** (а) Хімічна структура біциклолу (Віс, номер CAS: 118159-48-1, молекулярна формула:  $C_{19}H_{18}O_9$ , молекулярна маса: 390.35). (б) Представляє протоколи експериментів, використані для оцінки ефектів Віс на мишачій моделі APP/PS1. Скорочення: \* Віс — Біцикллол. APP/PS1 — білок-попередник амілоїду бета / пресенілін-1.

## Матеріали та методи

### Підготовка препарату

Біцикллол (артикул B45096, Shanghai Yuanye Biotechnology, Китай) із чистотою за ВЕРХ понад 98 % був отриманий від компанії Shanghai Yuan Ye Biological Co., Ltd. Для приготування робочого розчину порошок біциклолу розчиняли в диметилсульфоксиді (DMSO, Sigma-Aldrich, США) з утворенням концентрованого розчину (100  $\mu$ M), який потім розводили до необхідної концентрації для конкретних експериментів. Концентрація DMSO у кінцевих розчинах не перевищувала 0,1 %, щоб виключити можливий цитотоксичний вплив розчинника.

### Приготування олігомерів $A\beta_{1-42}$

Пептид  $A\beta_{1-42}$  (AS-24224, Eurogentec, Бельгія) спочатку розчиняли у гексафторізопропанолі (HFIP, Sigma-Aldrich). Після ультразвукової обробки, що сприяла формуванню плівки пептиду, розчин заморожували при  $-20$  °C. Перед використанням отриману мембрану розчиняли до концентрації 5 мМ у стерильному DMSO. Розчин зберігали при  $-20$  °C відповідно до протоколів, описаних раніше (An et al., 2020; Morroni et al., 2018).

### Тварини та умови утримання

Самців трансгенних мишей APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> віком 5 місяців ( $\approx 30 \pm 2$  г) та статевозрілих мишей лінії C57BL/6J (контроль) закуповували у компанії Beijing HFK Biotechnology Co., Ltd.

Тварин утримували при температурі  $23 \pm 1$  °C, відносній вологості  $\sim 55$  %, із 12-годинним циклом світло/темрява та вільним доступом до їжі й води.

Усі експерименти були схвалені Комітетом з догляду та використання лабораторних тварин Другої клініки Медичного університету Хебея (№ 2022-АЕ027) та проводилися відповідно до національних «Керівних принципів щодо догляду та використання лабораторних тварин».

## **Експериментальні групи та дози**

36 трансгенних мишей APP/PS1 випадковим чином розподілили на три групи (по 12 тварин):

Tg-Con — контроль (0,5 % карбоксиметилцелюлоза натрію, перорально),

Tg + Vic-L — біциклол 25 мг/кг,

Tg + Vic-H — біциклол 100 мг/кг.

Аналогічний розподіл застосовували до 36 мишей дикого типу (WT).

Обрані дози 25 та 100 мг/кг відповідають тим, які раніше демонстрували ефективність і безпеку в моделях уражень ЦНС та інших систем (Chen et al., 2023; Sun et al., 2009; Zhao et al., 2021).

Препарат вводили перорально (через зонд) щоденно протягом 2 місяців. Поведінкові тести проводили після завершення періоду лікування.

## **Тест розпізнавання нового об'єкта (NOR)**

Методика NOR модифікована за Zhang et al. (2021).

Мишей поміщали у відкриту експериментальну камеру для адаптації на 10 хв. На другий день у камеру встановлювали два ідентичні за формою та кольором об'єкти; тваринам дозволяли досліджувати їх протягом 5 хв.

На третій день один об'єкт замінювали на новий (іншої форми та кольору), знову надаючи 5 хв для дослідження.

Час контакту зі знайомим об'єктом позначали  $T_f$ , з новим —  $T_n$ . Розрахунок індексу переваги нового об'єкта виконували за формулою:

$$\text{Індекс} = T_n / (T_n + T_f).$$

Камеру та предмети очищували 75 % етанолом після кожного тесту, щоб усунути запахові сліди.

## **Тест Y-лабіринту**

Методика взята з Lee et al. (2022) з невеликими змінами.

Мишу поміщали в один із рукавів лабіринту та дозволяли вільне пересування протягом 8 хв.

Записували послідовність відвідування рукавів. Послідовний вхід у три різні рукави вважали правильним вибором.

Коефіцієнт спонтанного чергування обчислювали за формулою:

$$\text{Коефіцієнт} = n / (N - 2),$$

де  $n$  — число правильних комбінацій,  $N$  — загальна кількість входів.

Після кожного досліджу лабіринт протирали 75 % спиртом.

### **Водний лабіринт Морріса (MWM)**

Тест MWM проводили для оцінки просторового навчання та довготривалої пам'яті (Tang et al., 2022).

Круглий басейн (діаметр 120 см, висота 45 см) заповнювали водою  $\sim 21 \pm 1$  °C. Платформа (діаметр 12 см) знаходилася на 1 см нижче поверхні води у визначеному квадранті.

За день до тесту мишей навчали плаванню та поміщали на платформу на 10 с.

Далі проводили 5-денне тренування (по 4 запливи на день, максимум 60 с). Якщо миша не знаходила платформу, фіксували максимальну затримку 60 с та вручну поміщали її на платформу на 10 с.

На 6-й день проводили пробу без платформи (60 с). Оцінювали час, проведений у цільовому квадранті, та число перетинів попереднього місця розташування платформи.

### **Підготовка мозкової тканини**

Після завершення поведінкових тестів тварин умертвляли. Мозок вилучали, робили сагітальні зрізи.

Одну півкулю фіксували у 4 % параформальдегіді (24 год, 4 °C), потім зневоднювали у 30 % сахарозі та заливали в OCT-середовище. На кріостаті (Leica CM1850) готували зрізи 8 мкм для імунофлуоресценції.

Другу півкулю (кору) заморожували при  $-80$  °C для біохімічного аналізу.

### **TUNEL-фарбування**

Для виявлення апоптозних нейронів зрізи фарбували за методом TUNEL (набір MK1018, Boster Biological, Китай).

Підрахунок позитивних (TUNEL<sup>+</sup>) нейронів у корі головного мозку проводили у трьох неперекривних полях зору у 5 мишей кожної групи.

### **Імунофлуоресцентне фарбування**

Зрізи товщиною 8 мкм тричі промивали PBS (по 10 хв), обробляли 1 % Triton X-100 (30 хв), потім блокували 5 % сироватковим альбуміном (BSA) протягом 1 год.

Інкубували з первинним антитілом до нейронального ядерного білка NeuN (1:100, Millipore, ABN78) при 4 °C протягом ночі.

Потім додавали вторинне антитіло Alexa Fluor 594 (1:1000, Jackson ImmunoResearch) — 1 год при кімнатній температурі.

Фарбування ядер виконували DAPI. Зображення отримували на флуоресцентному мікроскопі.

### **Визначення рівнів $A\beta_{1-40}$ та $A\beta_{1-42}$**

Коркову тканину піддавали лізису, центрифугували (12 000 × g, 10 хв, 4 °C). Вміст  $A\beta_{1-40}$  та  $A\beta_{1-42}$  визначали методом ELISA (Thermo Fisher Scientific, США) відповідно до інструкції виробника.

### **Визначення MDA, SOD та GSH-Px**

Після гомогенізації кори отримували супернатант, білок визначали методом BCA (набір Solarbio, Китай).

Активність SOD та GSH-Px, а також вміст MDA вимірювали за допомогою комерційних наборів (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Китай).

Результати виражали в одиницях на мг білка.

### **Визначення внутрішньоклітинного рівня ROS**

Для вимірювання ROS використовували набір Beyotime (S0033S).

Свіжу тканину кори розрізали на шматки ~1 мм<sup>3</sup>, перетравлювали ферментним розчином 20–30 хв при 37 °C з періодичним перемішуванням. Отримані клітини інкубували з 10 мкМ DCFH-DA протягом 20 хв при 37 °C у темряві. Інтенсивність флуоресценції вимірювали при λ збудж. 488 нм / λ ем. 525 нм.

Для клітин N2A процедура була аналогічною; спостереження проводили на лазерному мікроскопі Zeiss Vert.A1 (Німеччина).

### **Клітинна культура та обробка**

Клітини Neuro-2a (лінія N2A, миша) культивували у середовищі DMEM (Thermo Fisher), що містило 10 % фетальну сироватку FBS та 1 % пеніцилін/стрептоміцин, при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

При досягненні 70–80 % конфлюентності клітини інкубували з біциклолом 4 год, а потім додавали олігомери  $A\beta_{1-42}$  на 24 год.

Створювали чотири групи:

1. Контроль (0,1 % DMSO),
2. Біциклол (25 μM),
3.  $A\beta$  (10 μM),
4.  $A\beta$  + Біциклол (25 μM попередня обробка +  $A\beta$  10 μM).

### **Оцінка життєздатності клітин**

Життєздатність клітин N2A визначали тестом CCK-8 (Boster Biotechnology, Китай).

Клітини висівали у 96-лункові планшети та обробляли різними концентраціями  $A\beta$  (0–20 μM) або біциклолу (0–100 μM). Після інкубації додавали 10 μл розчину CCK-8 на 2 год, абсорбцію вимірювали при 450 нм.

## **Аналіз апоптозу**

Апоптоз оцінювали за допомогою набору Annexin V-PE/7-AAD (CA1030, Solarbio).

Після обробки клітини відмивали PBS, ресуспендували, витримували 5 хв у темряві з Annexin V-PE (5  $\mu$ л), а потім додавали 7-AAD (10  $\mu$ л 20 мкг/мл).

Дані аналізували методом проточної цитометрії та обробляли у програмі FlowJo.

## **Трансфекція siRNA до Nrf2**

Клітини N2A у 6-лункових планшетах трансфікували siRNA проти Nrf2 або контрольною NC-siRNA (компанія GenePharma, Китай) за допомогою Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher).

Через 24 год клітини інкубували з біциклолом 4 год, а потім експонували  $A\beta_{1-42}$  протягом 24 год.

## **Імуноблотинг (Western blot)**

Загальний білок екстрагували з кори мозку та клітин N2A (набір Applygen P1205); окремо виділяли цитоплазматичні та ядерні фракції (набір NUC-Cyto-MEM P1201).

Білки розділяли методом SDS-PAGE та переносили на мембрани PVDF (0,22 мкм).

Після блокування (5 % знежирене молоко, 1 год, кімнатна  $T^\circ$ ) мембрани інкубували з первинними антитілами проти Nrf2, HO-1, NQO1, Вах, Bcl-2, Cleaved Caspase-3,  $\beta$ -actin та Histone H3 (відповідні каталожні номери та розведення збережені з оригіналу).

Вночі при 4  $^\circ$ C проводили інкубацію, потім три промивання TBST та вторинні антитіла HRP-кон'юговані (1 год).

Візуалізацію виконували з використанням ECL-реагентів.

## **Кількісна ПЛР у реальному часі (RT-qPCR)**

Зразки РНК виділяли з кори мишей та клітин N2A (набір Aidlab).

Після зворотної транскрипції (SureScript cDNA Kit, GeneCopoeia) проводили qPCR із праймерами до генів Nrf2, HO-1, NQO1, Вах, Bcl-2 та Caspase-3; як контрольний ген використовували GAPDH.

Відносну експресію розраховували за методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

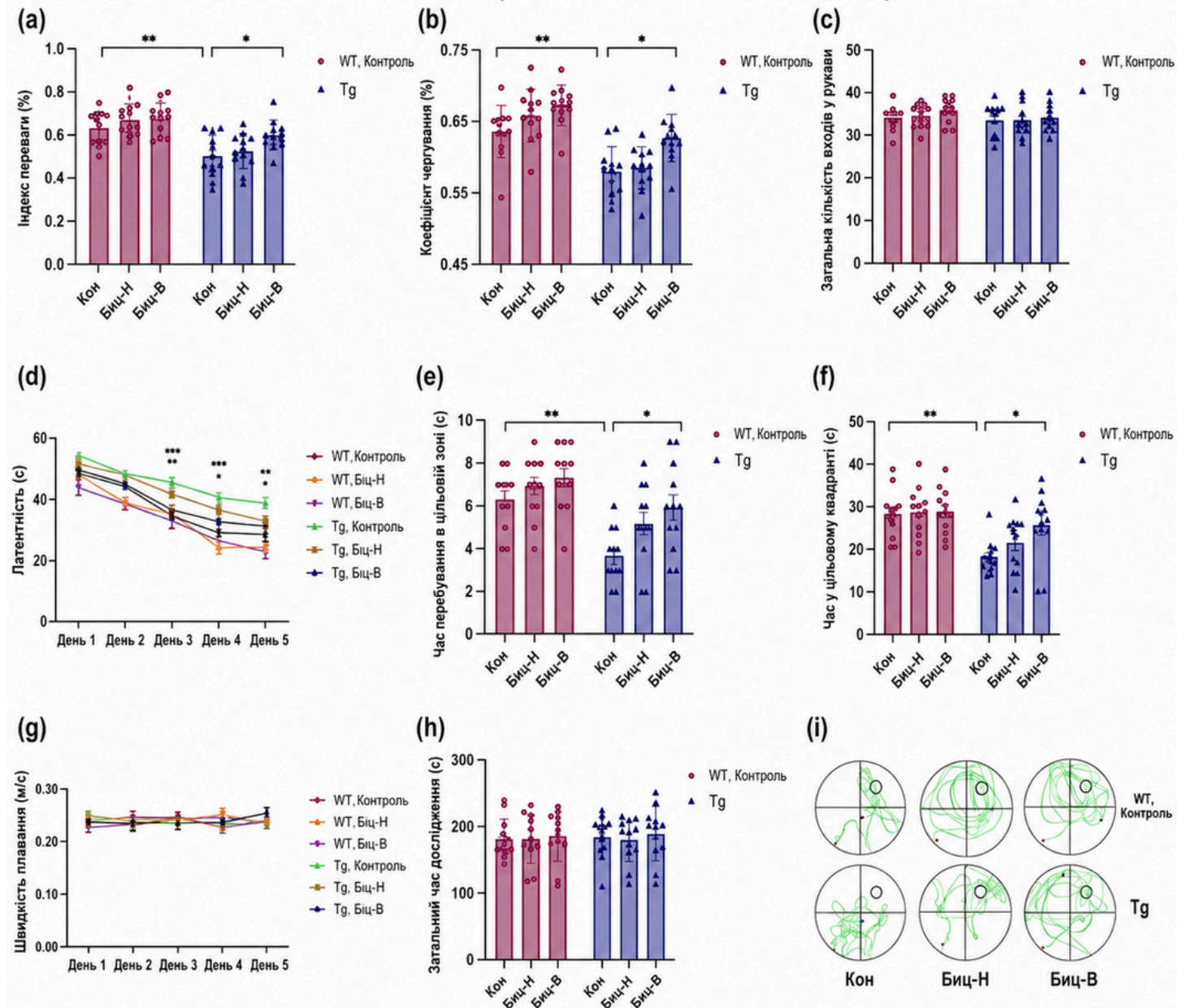
Статистичний аналіз

Дані представлені як середнє  $\pm$  стандартна похибка середнього (SEM).

Застосовували методи багатократного дисперсійного аналізу (ANOVA з повторними вимірюваннями, однофакторний та двофакторний ANOVA) з пост-тестом Тьюкі для множинних порівнянь (SPSS v23.0).

Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## РИСУНОК 2. ЕФЕКТИ ЛІКУВАННЯ БІЦИКЛОЛОМ НА КОГНІТИВНУ ФУНКЦІЮ У МИШЕЙ APP/PS1



**Рисунок 2.** Лікування біциклолом (Біс) пом'якшує когнітивні порушення у мишей лінії APP/PS1. Біциклол (у дозуванні 25 мг/кг або 100 мг/кг маси тіла) вводили перорально через зонд трансгенним мишам APP/PS1 (група Tg) або контрольним мишам дикого типу (WT) лінії C57BL/6 того ж віку (починаючи з 5-місячного віку) протягом 2 місяців поспіль. Миші, які отримували 0,5 % розчин натрій-карбоксиметилцелюлози, становили контрольну групу (Кон). (a) Коефіцієнт дискримінації у тесті на розпізнавання нового об'єкта (NOR) у мишей Tg та WT. Індекс переваги нового об'єкта =  $T_n / (T_n + T_f)$ , де  $T_f$  — час розпізнавання знайомого об'єкта, а  $T_n$  — час розпізнавання нового об'єкта. (h) У тесті NOR загальний час дослідження не показав суттєвих відмінностей між усіма групами, що вказує на те, що відмінності у когнітивних функціях не були пов'язані зі змінами рухової активності або мотивації до дослідження. Вплив Біс на (b) чергування та (c) загальну кількість заходів у рукави у мишей APP/PS1 оцінювали за допомогою тесту в Y-подібному лабіринті. Коефіцієнт чергування =  $n / (N - 2)$ , де  $n$  — кількість правильних виборів, а  $N$  — загальна кількість заходів кожної миші. ## $P < 0,01$  порівняно з групою WT, Кон. \* $P < 0,05$  порівняно з групою Tg, Кон. (d) Тест у водному лабіринті Морріса (MWM) використовували для оцінки довготривалої та просторової пам'яті мишей. Протягом перших двох днів тесту з видимою платформою суттєвих відмінностей у латентному періоді втечі (часі пошуку) між групами мишей не спостерігалось. У подальшому навігаційному тесті під час пошуку прихованої платформи миші групи Tg-кон показали триваліший латентний період, ніж миші WT-кон на 3-й, 4-й та 5-й дні, а Біс у високому дозуванні (Біс-Н) зміг полегшити цей дефіцит у мишей Tg. ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  група Tg, Кон проти групи WT, Кон; \* $P < 0,05$  та \*\* $P < 0,01$  група лікування Tg проти групи Tg, Кон. На 6-й день тесту MWM

(без платформи) був проведений кількісний аналіз пробного тесту: (e) показує кількість перетинів мишами місця, де раніше знаходилася платформа. Миші Tg перетинали це місце рідше, ніж миші WT. Лікування Віс збільшило кількість перетинів у мишей Tg. (f) показує час, проведений мишами у цільовому квадранті: миші WT проводили в ньому більше часу, ніж миші Tg. Лікування Віс збільшило час перебування мишей Tg у цільовому квадранті.  $##P < 0,01$  порівняно з групою WT, Con.  $*P < 0,05$  порівняно з групою Tg, Con. (g) Середня швидкість плавання на 1–5 дні фази навчання у тесті MWM. (i) Траєкторії плавання мишей показують результати у пробному випробуванні тесту MWM. Червоні точки представляють положення тварини на початку тесту, сині точки — положення наприкінці тесту. Для оцінки статистичної значущості застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з повторними вимірюваннями. Усі дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього (n=12). Скорочення: Віс — біциклол; APP/PS1 — білок-попередник амілоїду бета / пресенілін-1; NOR — розпізнавання нового об'єкта; MWM — водний лабіринт Морріса; WT — дикий тип; Tg — трансгенна група.

## Результати

### 1. Біциклол знижує когнітивні порушення у мишей лінії APP/PS1

У тесті розпізнавання нового об'єкта (NOR) трансгенні миші (Tg-контроль) демонстрували нижчий індекс переваги нового об'єкта порівняно з мишами дикого типу (WT-контроль), що відображає дефіцит пам'яті.

Після лікування біциклолом у високій дозі (Віс-Н) Tg-миші витрачали значно більше часу на дослідження нового об'єкта (рис. 2 а). Це вказує на відновлення когнітивної здатності розпізнавати нові стимули.

Загальний час дослідження об'єктів суттєво не відрізнявся між групами ( $p > 0,05$ ; рис. 2 б), що виключає вплив рухової активності або мотивації.

У тесті Y-лабіринту частота спонтанних чергувань у трансгенних мишей була знижена порівняно з контролем WT, однак у групі Tg + Віс-Н спостерігалось помітне покращення (рис. 2 в). Загальна кількість входів у рукави не відрізнялася між групами ( $p > 0,05$ ; рис. 2 с).

У тесті водного лабіринту Морріса (MWM) Tg-миші мали значно збільшений латентний час пошуку платформи у дні 3–5 порівняно з WT-контролем; лікування Віс-Н достовірно зменшувало цей показник (рис. 2 d). Під час проби без платформи (день 6) Tg-миші перетинали місце попереднього розташування платформи рідше (рис. 2 е) та проводили менше часу у цільовому квадранті (рис. 2 f). Після терапії біциклолом ці параметри суттєво покращувалися.

Середня швидкість плавання не відрізнялася між групами ( $p > 0,05$ ; рис. 2 g), що підтверджує когнітивний, а не моторний ефект препарату. На траєкторіях руху Tg-контроль демонстрував хаотичні маршрути пошуку, тоді як Віс-Н відновлював цілеспрямовані патерни (рис. 2 і).

Таким чином, біциклол покращує просторове навчання та пам'ять у моделі APP/PS1.

### 2. Біциклол запобігає апоптозу нейронів у фронтальній корі APP/PS1-мишей

Для оцінки апоптозу нейронів застосовували подвійне фарбування TUNEL та NeuN.

У трансгенних мишей спостерігалось значне збільшення кількості TUNEL<sup>+</sup> клітин та зниження щільності NeuN<sup>+</sup> нейронів порівняно з WT-контролем.

Лікування Віс-Н суттєво зменшувало кількість TUNEL<sup>+</sup> клітин та підвищувало кількість NeuN<sup>+</sup> нейронів (рис. 3 а–с), що вказує на виражений нейропротекторний та антиапоптотичний ефект препарату.

### **3. Біциклол знижує рівень Аβ у корі головного мозку APP/PS1-мишей**

За результатами ELISA у корі трансгенних мишей рівні Аβ<sub>1–40</sub> та Аβ<sub>1–42</sub> були значно підвищені відносно значень у WT.

Після терапії Віс-Н ці показники достовірно знижувалися (рис. 4 а, б), що свідчить про здатність біциклолу зменшувати амілоїдний патерн у мозковій тканині.

### **4. Біциклол послаблює оксидативний стрес у корі APP/PS1-мишей**

У контрольній Tg-групі спостерігалось значне зростання рівня ROS у корі порівняно з WT-контролем, тоді як лікування Віс-Н викликало помітне зниження (рис. 4 с).

Активність ферментів GSH-Px та SOD була знижена у Tg-контролю та відновлювалася після терапії Віс-Н (рис. 4 d, e).

Вміст MDA — маркера ліпідного пероксидаційного ушкодження — підвищувався у трансгенних мишей та знижувався після Віс-Н (рис. 4 f).

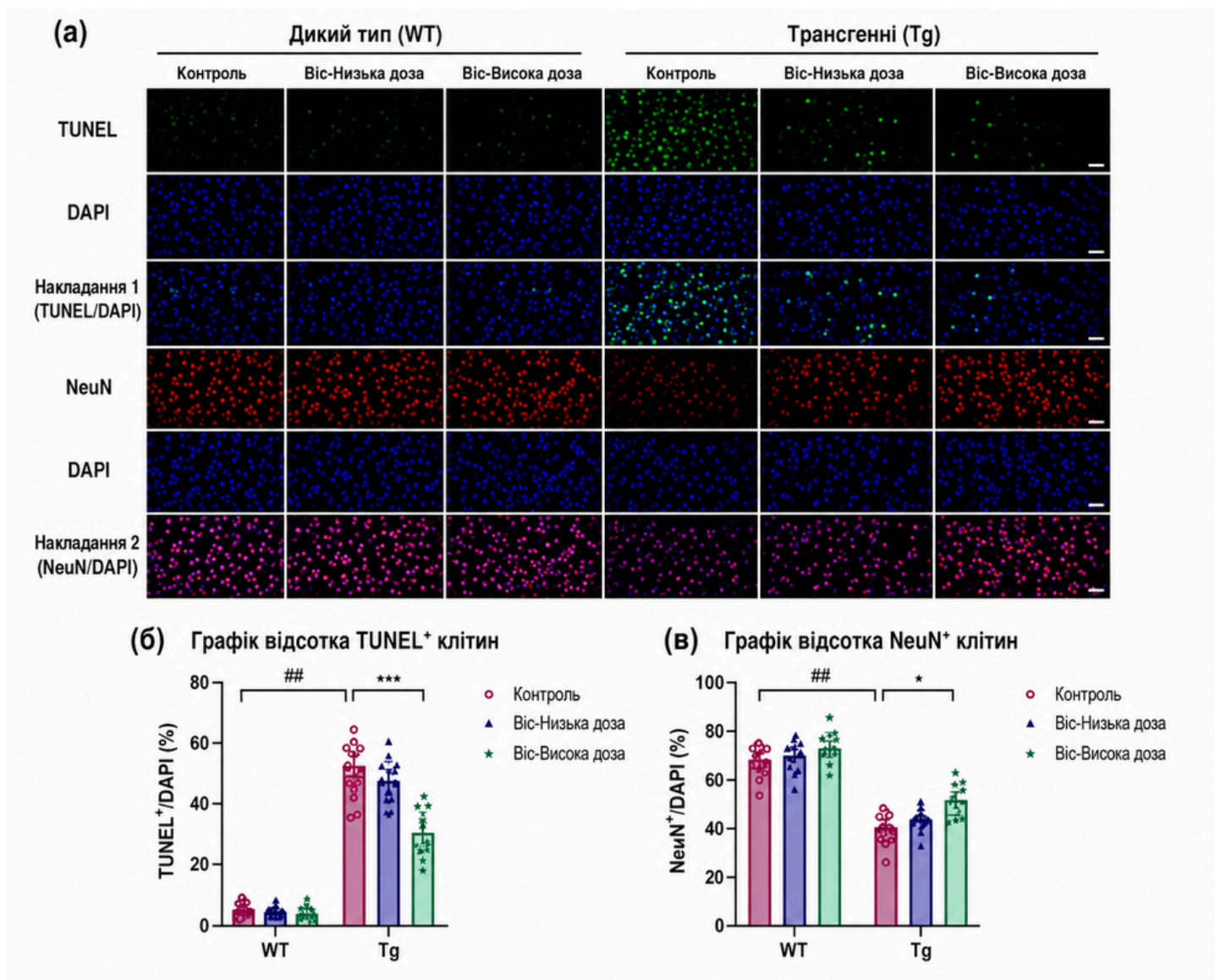
Ці результати вказують, що біциклол усуває дисбаланс між про- та антиоксидантними процесами.

### **5. Біциклол регулює експресію про- та антиапоптотичних білків у корі APP/PS1-мишей**

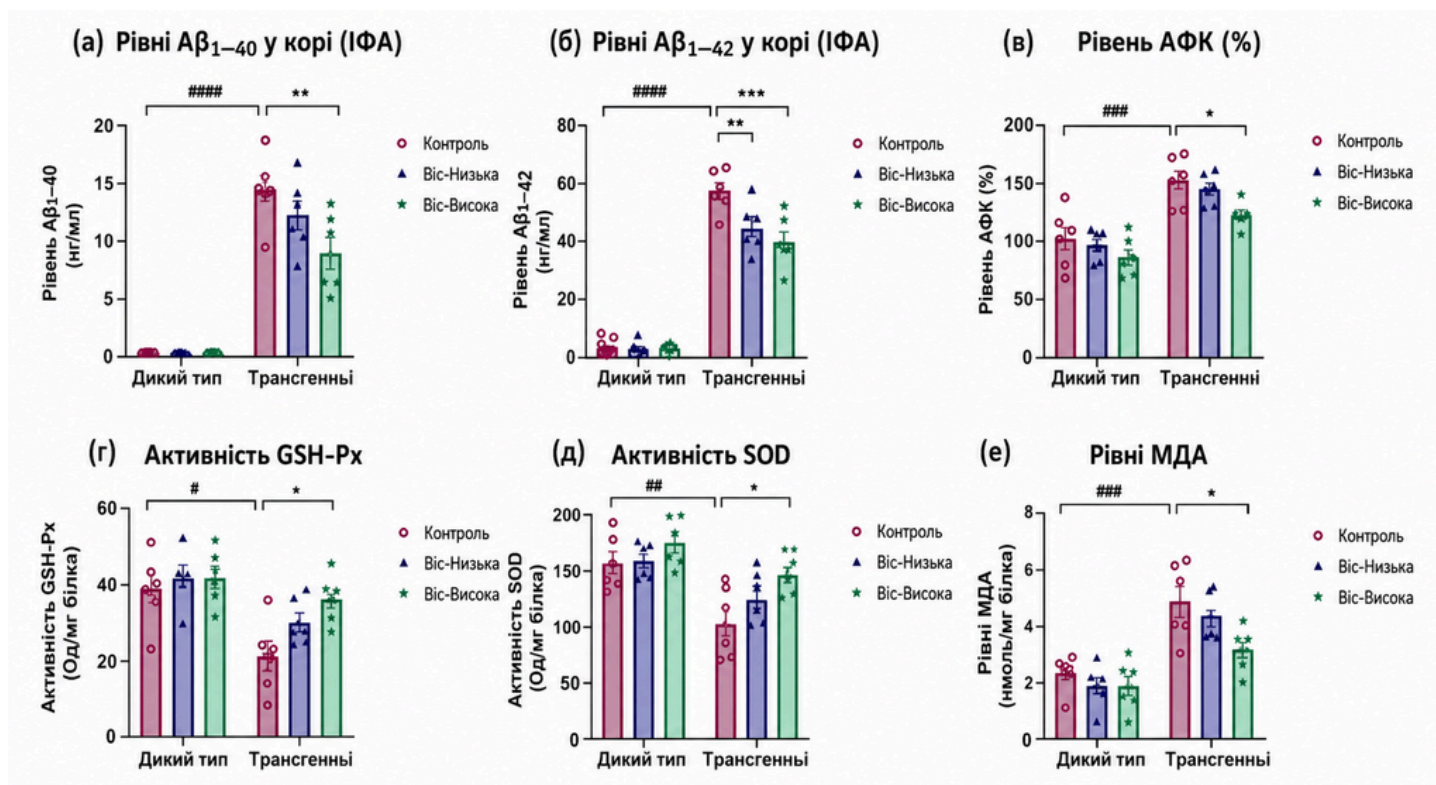
Аналіз Western blot показав, що у Tg-контролю рівні проапоптотичних білків Bax та Cleaved caspase-3 значно підвищені, тоді як антиапоптотичний Bcl-2 знижений порівняно з WT (рис. 5 а, f–h).

Терапія Віс-Н нормалізувала ці параметри — підвищувала Bcl-2 та знижувала Bax і активну каспазу-3.

RT-qPCR підтвердила аналогічні зміни на рівні мРНК (рис. 5 l–n). Це свідчить про здатність біциклолу пригнічувати апоптоз нейронів на генному та білковому рівні.



**Рисунок 3.** Віс (біциклол) запобігає загибелі нейронів та посилює нейрогенез у лобовій корі мишей лінії APP/PS1. Патологічні зміни, пов'язані з хворобою Альцгеймера (ХА), були виявлені у мозку трансгенних мишей APP/PS1, які отримували Віс (у дозуванні 25 мг/кг або 100 мг/кг маси тіла) або 0,5 % натрій-карбоксиметилцелюлозу (група контролю, Con). (а) Імунофлуоресцентний аналіз TUNEL-позитивних (TUNEL<sup>+</sup>) та NeuN-позитивних (NeuN<sup>+</sup>) клітин у лобовій корі різних груп дослідження. Результати демонструють збільшення кількості TUNEL<sup>+</sup> клітин (зелений колір) та зниження кількості NeuN<sup>+</sup> клітин (червоний колір) у мозку мишей APP/PS1; для фарбування клітинних ядер використовувався DAPI (синій колір). Лікування високою дозою біциклолу (Віс-Н) інгібувало апоптоз та значно знижувало загибель коркових нейронів у трансгенних (Tg) мишей. Для кожної групи з п'яти тварин був узятий зріз з однієї й тієї самої ділянки лобової кори. Були вивчені три неперекривні поля зору та проведений електронно-мікроскопічний аналіз. Кількісний аналіз (б) TUNEL<sup>+</sup> клітин та (в) NeuN<sup>+</sup> клітин у лобовій корі. Статистичний аналіз проводився за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Масштабна лінійка = 50 мкм. Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього (n = 5). ####P < 0,001 порівняно з групою дикого типу (WT, Con). \*P < 0,05 та \*\*\*P < 0,001 порівняно з трансгенною контрольною групою (Tg, Con). Скорочення: Віс — біциклол. APP/PS1 — білок-попередник амілоїду-бета / пресенілін-1. TUNEL — метод мічення розривів ланцюгів ДНК (TdT-опосередковане включення dUTP). NeuN — нейрональний ядерний білок (маркер зрілих нейронів). WT — дикий тип. Tg — трансгенна група.



**Рисунок 4.** Віс (біцикллол) знижує рівні Аβ та зменшує оксидативний стрес у мишей APP/PS1. Тканину кори головного мозку мишей лізували та центрифугували, після чого був зібраний супернатант для проведення вимірювань методом імуноферментного аналізу (ІФА/ELISA). (а) Рівні мишачого Аβ<sub>1-40</sub> та (б) рівні мишачого Аβ<sub>1-42</sub> визначали методом ІФА. (в) Вміст АФК (активних форм кисню) у корі визначали за допомогою флуоресцентного зонда DCFH-DA. Показники активності (г) GSH-Px (глутатіонпероксидази), (д) SOD (супероксиддисмутази) та (е) вміст МДА (малонового діальдегіду) у корі головного мозку мишей. Рівень GSH визначали колориметричним методом, активність SOD вимірювали методом WST-1, а вміст МДА визначали після гомогенізації кори у фосфатно-сольовому буфері (PBS) з ЕДТА з подальшим проведенням ТБК-тесту (тесту з тіобарбітуровою кислотою). Статистичний аналіз проводився за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA); дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього (n = 6). ####P < 0,0001 порівняно з групою дикого типу (WT, Con). \*\*\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*P < 0,001 порівняно з трансгенною контрольною групою (Tg, Con). Скорочення: Віс — біцикллол. APP/PS1 — білок-попередник амілоїду-бета / пресенілін-1. Аβ — амілоїд-бета. ELISA (ІФА) — імуноферментний аналіз. ROS (АФК) — активні форми кисню. GSH-Px — глутатіонпероксидаза. SOD — супероксиддисмутаза. MDA (МДА) — малоновий діальдегід. WT — дикий тип. Tg — трансгенна група.

## 6. Біцикллол активує шлях Nrf2/HO-1 у мозку APP/PS1-мишей

У групі Tg-контроль відзначався знижений вміст ядерного Nrf2 (N-Nrf2), HO-1 та NQO1 відносно WT (рис. 5 а–е).

Після терапії Віс-Н рівні цитоплазматичного та ядерного Nrf2, HO-1 та NQO1 значно підвищувалися, що підтверджувалося також збільшенням мРНК цих генів (рис. 5 і–к).

Таким чином, біцикллол стимулює антиоксидантний каскад Nrf2/HO-1 у мозку моделі APP/PS1.

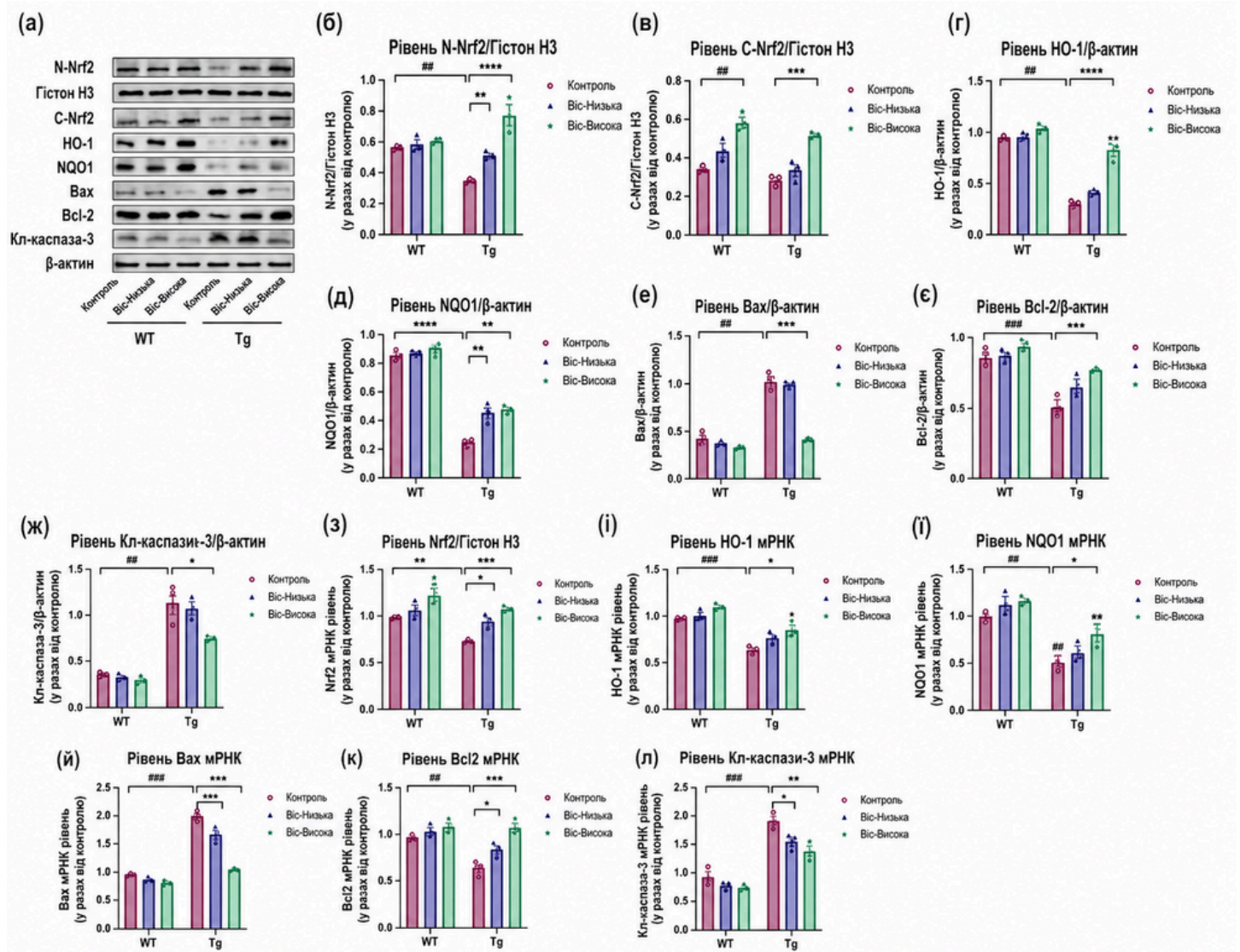
## 7. Біцикллол знижує цитотоксичність Аβ<sub>1-42</sub> у клітинах N2A in vitro

У досліджах на клітинах N2A токсичність Аβ<sub>1-42</sub> мала дозозалежний характер: при 10 μM життєздатність знижувалася приблизно на 50 % (рис. 6 а).

Сам біцикл (до 100  $\mu\text{M}$ ) не мав цитотоксичності (рис. 6 b). Попередня обробка N2A біциклолом запобігала ушкодженню, спричиненому  $\text{A}\beta_{1-42}$ , найефективніше при 25  $\mu\text{M}$  (рис. 6 c).

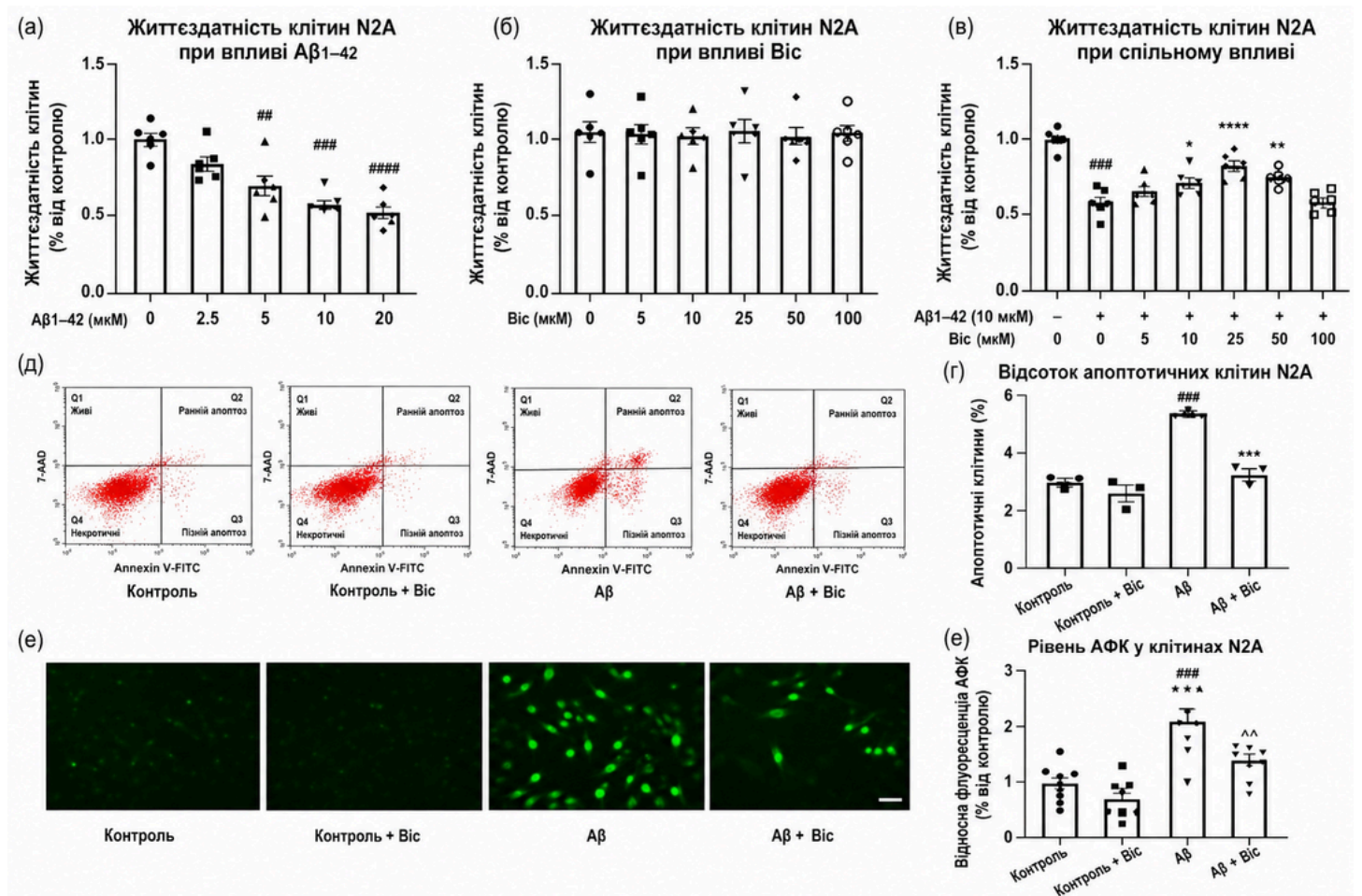
Ця концентрація використовувалася у подальших експериментах. Аналіз Annexin V/7-AAD підтвердив, що біцикл значно зменшує апоптоз, індукований  $\text{A}\beta_{1-42}$  (рис. 6 d).

Флуоресцентне фарбування DCFH-DA показало зменшення внутрішньоклітинного ROS після попередньої обробки біциклолом (рис. 6 e), що вказує на його антиоксидантну активність у нейрональних клітинах.



**Рисунок 5.** Віс (біцикл) регулює експресію проапоптотичних білків та мРНК у корі й активує шлях Nrf2/HO-1 у мишей APP/PS1. Рівні експресії ядерного Nrf2 (N-Nrf2), цитоплазматичного Nrf2 (C-Nrf2), HO-1, NQO1, Bax, Bcl-2 та розщепленої каспази-3 оцінювали у тканинах мозку трансгенних мишей APP/PS1 (Tg) та відповідних за віком мишей дикого типу (WT) лінії C57BL/6. Цим мишам вводили біцикл (Bic) у дозах 25 мг/кг або 100 мг/кг маси тіла чи контрольний розчин 0,5 % натрій-карбоксиметилцелюлози (Con). Репрезентативні зображення експериментів методом вестерн-блотингу ілюструють рівні білків, кількісний аналіз яких представлений на панелях (a) та (b–h). Аналіз рівнів мРНК (i) Nrf2, (j) HO-1, (k) NQO1, (l) Bax, (m) Bcl-2 та (n) каспази-3 проводили за допомогою ЗТ-ПЛР (RT-qPCR). Статистичний аналіз виконаний із використанням двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $n = 3$ ).  $\#P < 0,05$ ,  $\#\#\#P < 0,01$ ,  $\#\#\#\#P < 0,001$ ,  $\#\#\#\#\#P < 0,0001$  порівняно з групою дикого типу (WT, Con).  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ ,  $****P < 0,0001$

порівняно з трансгенною контрольною групою (Tg, Con). Скорочення: Віс — біцикллол. APP/PS1 — білок-попередник амілоїду-бета / пресенілін-1. Nrf2 — ядерний фактор 2, пов'язаний з еритроїдом 2 (ключовий регулятор антиоксидантної відповіді). HO-1 — гемоксигеназа-1. NQO1 — НАД(Ф)Н-хінон-оксидоредуктаза-1. Вах — В-клітинний лімфома-асоційований білок X (проапоптотичний). Bcl-2 — білок В-клітинної лімфоми-2 (антиапоптотичний). WT — дикий тип. Tg — трансгенна група.



**Рисунок 6.** Віс (біцикллол) інгібує цитотоксичність, індуковану Аβ1-42, послаблює апоптоз та знижує рівні АФК у клітинах N2A. (а) Клітини нейробластоми миші Neuro-2a (N2A) піддавалися спільній інкубації з різними концентраціями Аβ1-42 протягом 24 годин. Життєздатність клітин визначали за допомогою тесту ССК-8. Гістограми показують відсоток виживших клітин. Олігомери Аβ1-42 чинили дозозалежний ефект на загибель клітин N2A; концентрація 10 мкМ Аβ1-42 викликала зниження життєздатності майже на 50 %. Для подальших експериментів використовували дозу 10 мкМ Аβ1-42. (б) Життєздатність клітин визначали за допомогою тесту ССК-8 після обробки клітин N2A різними концентраціями Віс. Біцикллол не проявляв цитотоксичності щодо клітин N2A у концентраціях менше 100 мкМ. (в) Життєздатність клітин визначали за допомогою тесту ССК-8 після попередньої обробки клітин N2A різними концентраціями Віс з подальшою повторною інкубацією з Аβ1-42 (10 мкМ). Попередня обробка біцикллолом значно інгібувала цитотоксичні ефекти, викликані Аβ1-42 (10 мкМ), та проявляла ефективні захисні властивості у концентрації менше 50 мкМ, при цьому найбільш виражений захисний ефект спостерігався при 25 мкМ. Отже, у подальших експериментах використовували Віс у концентрації 25 мкМ. (г) Рівень апоптозу у клітинах N2A, оброблених Віс (25 мкМ) та/або Аβ1-42 (10 мкМ), оцінювали методом проточної цитометрії з використанням фарбування Annexin V PE / 7-AAD. Додатково був проведений кількісний аналіз для оцінки отриманих результатів. (д) Клітини N2A обробляли Віс (25 мкМ) протягом однієї години з подальшою спільною інкубацією з Аβ1-42 (10 мкМ) протягом тридцяти хвилин. Як контроль (плацебо) використовували диметилсульфоксид (DMSO). Після спільної інкубації клітини витримували з 10 мкМ DCFH-DA протягом двадцяти хвилин. Надалі рівні активних форм кисню (АФК) усередині клітин вимірювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа та проводили кількісний аналіз. Масштабна лінійка = 50 мкм. Статистичний аналіз проводився за

допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $n = 3$ ). ####P < 0,001, #####P < 0,0001 порівняно з контрольною групою. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, \*\*\*\*P < 0,0001 порівняно з групою A $\beta$ . Скорочення: Віс — біциклол. A $\beta$  — амілоїд-бета. N2A — клітини Neuro-2a. ROS (АФК) — активні форми кисню.

## **8. Біциклол послаблює апоптоз та знижує рівень АФК у клітинах N2A, індукованих A $\beta_{1-42}$**

Захисний ефект Віс проти апоптозу, викликаного A $\beta_{1-42}$  у клітинах N2A, оцінювали за допомогою проточної цитометрії у поєднанні з фарбуванням Annexin V/PE. Результати виявили значне збільшення кількості апоптотичних клітин у групі, що отримувала A $\beta$ , порівняно з контрольною групою. Примітно, що попередня обробка Віс помітно знижувала апоптотичну активність, викликану A $\beta_{1-42}$ , як показано на рис. 6(d).

Ці спостереження дозволяють припустити, що Віс відіграє важливу роль в інгібуванні апоптозу клітин N2A, індукованого A $\beta_{1-42}$ , підкреслюючи його потенційні захисні властивості у даному контексті.

Для подальшого вивчення механізмів, що лежать в основі, були оцінені внутрішньоклітинні рівні активних форм кисню (АФК) за допомогою фарбування DCFH-DA, як показано на рис. 6(e). Мікроскопічне дослідження показало, що обробка 10 мкМ A $\beta_{1-42}$  значно підвищила інтенсивність флуоресценції у клітинах N2A порівняно з контрольною групою, що вказує на підвищену продукцію АФК.

Натомість у клітинах, попередньо оброблених 25 мкМ Віс, спостерігалось помітне зниження інтенсивності флуоресценції, пов'язаної з рівнями внутрішньоклітинних АФК. Це свідчить про те, що Віс не лише захищає від апоптозу, але й може пом'якшувати оксидативний стрес у клітинах N2A, викликаний впливом A $\beta_{1-42}$ .

## **9. Біциклол регулює експресію молекул апоптозу через активацію шляху Nrf2/НО-1 у нейрональних клітинах**

Аналіз Western blot показав, що при обробці A $\beta_{1-42}$  активація Nrf2 різко пригнічувалася, тоді як біциклол підвищував рівні N-Nrf2, С-Nrf2, НО-1 та NQO1, одночасно знижуючи експресію Вах та Cleaved Caspase-3 (рис. 7 а–h).

На рівні мРНК (рис. 7 і–п) відзначалися ідентичні зміни.

Для підтвердження ключової ролі Nrf2 була проведена трансфекція siRNA проти Nrf2.

Нокдаун Nrf2 зменшував експресію НО-1 та NQO1 і підвищував Вах та Cleaved Caspase-3.

Попередня обробка біциклолом відновлювала ці показники, але ефект зникав при пригніченні Nrf2 (рис. 8 а–m).

Отже, антиоксидантні та антиапоптотичні дії біциклолу опосередковуються активацією шляху Nrf2/НО-1.

Таким чином, сукупність даних *in vivo* та *in vitro* показує, що біциклол покращує когнітивні функції, зменшує оксидативний стрес та апоптоз нейронів у моделях хвороби Альцгеймера,

головним чином через активацію сигнального каскаду Nrf2/НО-1.

## Обговорення

Хвороба Альцгеймера (ХА) є однією з головних причин деменції — розладу, при якому страждають множинні когнітивні функції та знижується здатність людини виконувати повсякденну й професійну діяльність (Jazvinščak Jembrek та ін., 2015; Scheltens та ін., 2021). Складність патогенезу у поєднанні з різноманітним клінічним проявом робить розробку ефективних методів лікування вкрай складним завданням.

В останні роки були схвалені моноклональні антитіла проти агрегованих форм  $\beta$ -амілоїду — леканемаб та донамемаб, які здатні знижувати амілоїдне навантаження у мозку та помірно уповільнювати клінічне прогресування захворювання на ранніх стадіях (Cummins та ін., 2023; Kang, 2024; Villain та ін., 2025). Однак їх широке застосування обмежують необхідність внутрішньовенного введення, ризик розвитку ускладнень типу АRIA (Amyloid-related imaging abnormalities) та вузьке коло показань — лише пацієнти з підтвердженою амілоїдною патологією та легкою стадією хвороби (Espey та ін., 2024; Wang та ін., 2025).

Тому зберігається потреба у безпечних пероральних препаратах, які могли б доповнювати або посилювати ефект антитіл, а також використовуватися у пацієнтів, які не підходять для імунотерапії.

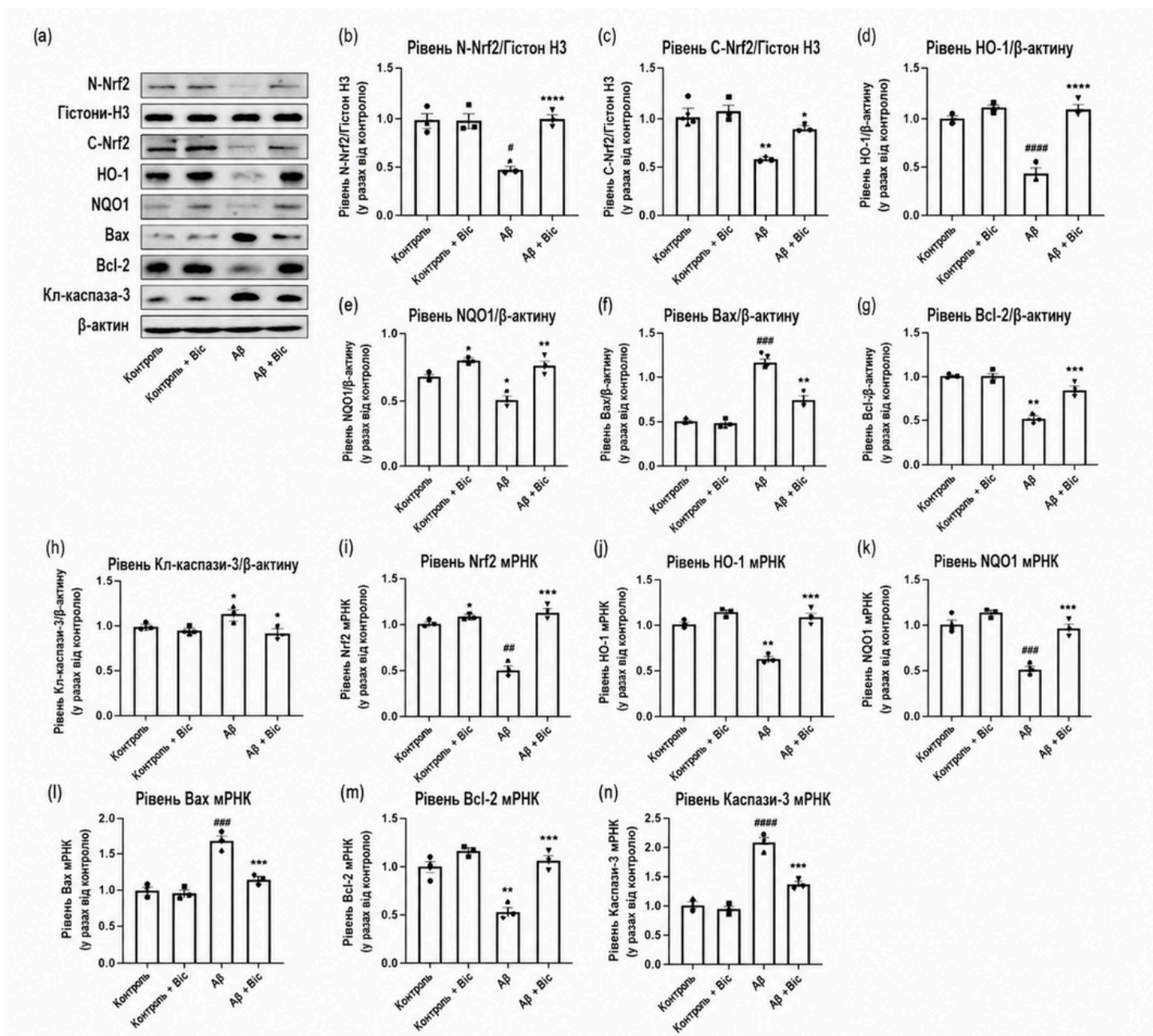
Ці дослідження показує, що біциклол здатний виконувати подібну функцію: він має хорошу біодоступність при пероральному прийомі, покращує пізнавальні здібності та захищає нервові клітини від оксидативного стресу й апоптозу у мишей APP/PS1 та у клітинних моделях.

### Нейропротекторні ефекти біциклолу

Біциклол — запатентований гепатопротектор китайського походження, синтезований зі сполук лимонника китайського (*Schisandra chinensis*). Препарат схвалений Державним управлінням з контролю за продуктами та лікарськими засобами КНР (Li та ін., 2004) і має численні фармакологічні ефекти: антиоксидантний, протизапальний, кардіопротекторний та нейропротекторний (Cui та ін., 2013; Zhang та ін., 2013; Zhang та ін., 2014; Zhao та ін., 2020; Li та ін., 2022).

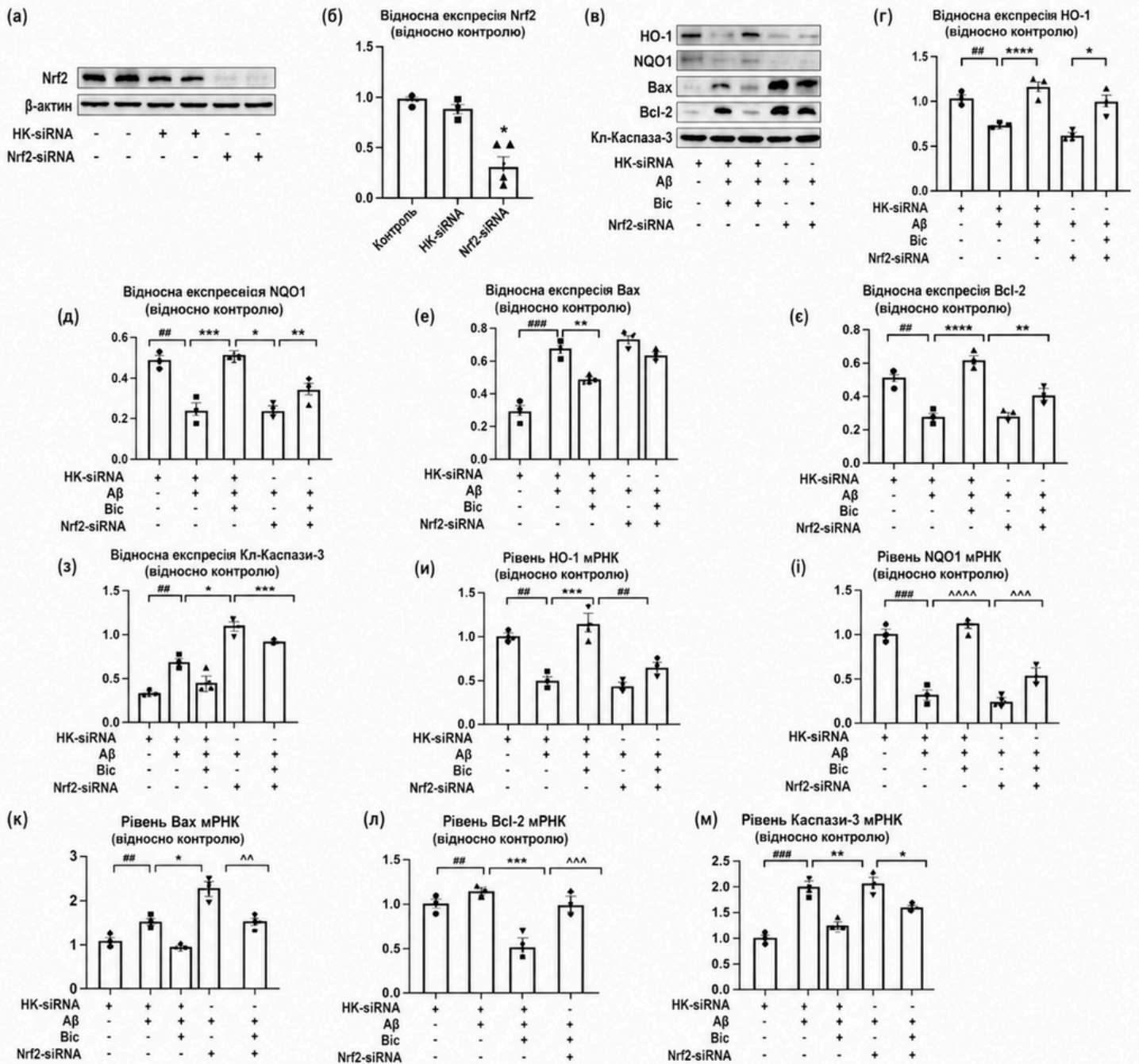
Хоча фармакокінетика біциклолу саме у моделі ХА раніше не вивчалася, відомо, що у мишей APP/PS1 до 7-місячного віку порушується цілісність гематоенцефалічного бар'єра (Wang та ін., 2022), що, ймовірно, сприяє проникненню біциклолу у мозкову тканину. У подальших роботах планується використовувати LC-MS/MS для кількісного підтвердження його розподілу у головному мозку.

Наші дані демонструють, що біциклол достовірно покращував результати в усіх поведінкових тестах (NOR, Y-maze, MWM) та одночасно знижував накопичення  $A\beta_{1-40}$  і  $A\beta_{1-42}$  у мозку. Одночасно відзначалося зменшення апоптозу нейронів та відновлення активності антиоксидантних ферментів SOD і GSH-Px. Таким чином, покращення когнітивних функцій корелює зі зменшенням оксидативного стресу та апоптозу.



**Рис. 7.** Попередня обробка Віс (біциклолом) активує Nrf2 та регулює експресію білків родини Bcl-2 у клітинах N2A, підданих впливу Аβ. Клітини N2A спочатку обробляли Віс (25 мкМ) протягом 4 годин, після чого проводили 24-годинну інкубацію з Аβ<sub>1–42</sub> (10 мкМ). (а) Рівні експресії білків ядерного Nrf2 (N-Nrf2), цитоплазматичного Nrf2 (C-Nrf2), HO-1, NQO1, Вах, Bcl-2 та розщепленої каспази-3 аналізували методом вестерн-блотингу. (б) N-Nrf2 (нормований за Н3) та (в–з) C-Nrf2, HO-1, NQO1, Вах, Bcl-2 і розщеплена каспаза-3 (нормовані за β-актином) представлені у вигляді відношення до контрольної групи. Аналіз рівнів мРНК (и) Nrf2, (к) HO-1, (л) NQO1, (м) Вах, (н) Bcl-2 та (о) каспази-3 з використанням ЗТ-ПЛР (RT-qPCR). Статистичний аналіз проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Дані представлені як середнє значення ± стандартна похибка середнього (n = 3). #P < 0,05, ###P < 0,01, ####P < 0,001, #####P < 0,0001 порівняно з контрольною групою. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, \*\*\*\*P < 0,0001 порівняно з групою Аβ. Скорочення: Віс — біциклол. Аβ — амілоїд-бета. N2A — клітини Neuro-2a. Nrf2 — ядерний фактор 2, пов'язаний з еритроїдом 2. HO-1 — гемоксигеназа-1. NQO1 — НАД(Ф)Н-хінон-оксидоредуктаза-1. Вах — В-клітинний лімфома-асоційований білок X. Bcl-2 — білок В-клітинної лімфоми-2.

**Рис. 8.** Nrf2 має вирішальне значення для нейропротекції та антиоксидантної регуляції, опосередкованої Віс



**Рис. 8.** Нейропротекторні ефекти Віс (біциклолу) проти нейротоксичності, індукованої А $\beta$ 1–42, через шлях Nrf2/HO-1 у клітинах N2A. Мала інтерферуюча РНК до Nrf2 (Nrf2 siRNA) та негативний контроль (NC siRNA) були трансфіковані у клітини N2A. Після 24-годинного культивування у безсироватковому середовищі клітини обробляли Віс (25 мкМ) протягом 4 годин, після чого вони піддавалися впливу А $\beta$ 1–42 (10 мкМ) упродовж 24 годин. (а) Експресію Nrf2 оцінювали за допомогою вестерн-блотингу. (б) Відносні рівні експресії Nrf2 були кількісно визначені методом денситометричного аналізу. (в) Репрезентативні зображення вестерн-блотів для HO-1, NQO1, Bax, Bcl-2 та розщепленої каспази-3, а також (г–з) кількісний аналіз даних вестерн-блотингу. Аналіз рівнів мРНК (и) HO-1, (к) NQO1, (л) Bax, (м) Bcl-2 та (н) каспази-3 за допомогою ЗТ-ПЛР (RT-qPCR). Порівняно з групою А $\beta$ , рівні білка та мРНК HO-1, NQO1 та Bcl-2 значно підвищилися після попередньої обробки біциклолом у клітинах N2A. Натомість рівні білка та мРНК Bax і розщепленої каспази-3 значно знизилися. Трансфекція Nrf2 siRNA скасовувала (обертала) підвищення рівнів HO-1, NQO-1 та Bcl-2, а також зниження рівнів Bax і розщепленої каспази-3 у клітинах N2A, оброблених Віс. Статистичний аналіз проводився за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього (n = 3). #P < 0,05, ##P < 0,01, ###P < 0,001, ####P < 0,0001 порівняно з контрольною групою. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, \*\*\*\*P <

0,0001 порівняно з групою Аβ. &P < 0,05, &&P < 0,01, &&&P < 0,001 порівняно з групою Nrf2 siRNA + Віс. Скорочення: Віс — біциклол. Аβ — амілоїд-бета. N2A — клітини Neuro-2a. Nrf2 — ядерний фактор 2, пов'язаний з еритроїдом 2. HO-1 — гемоксигеназа-1. NQO1 — НАД(Ф)Н-хінон-оксидоредуктаза-1. Вах — В-клітинний лімфома-асоційований білок X. Bcl-2 — білок В-клітинної лімфоми-2.

## **Оксидативний стрес і шлях Nrf2/HO-1 у патогенезі ХА**

Оксидативний стрес викликає каскад ушкоджень у нейронах: мітохондріальну дисфункцію, активацію глії, запальні реакції, порушення синаптичної передачі та, як наслідок, програмовану загибель клітин (апоптоз) (Jazvinščak Jembrek та ін., 2015). Надлишок ROS ушкоджує білки та ДНК, активуючи мітохондріальні механізми апоптозу (Schieber і Chandel, 2014).

β-амілоїд безпосередньо посилює утворення ROS і тим самим запускає процес клітинної загибелі (Butterfield та ін., 2010; Cai та ін., 2011; Ill-Raga та ін., 2010; Shelat та ін., 2008; Wan та ін., 2011). У результаті формується патологічне «хибне коло»: амілоїд підвищує ROS, ROS посилюють апоптоз і запалення, що прискорює нейродегенерацію (Bai та ін., 2022).

У нашому дослідженні APP/PS1-миші мали підвищені рівні ROS та MDA і низьку активність ферментів SOD та GSH-Px, що вказує на виражений оксидативний стрес. Аналогічні результати отримані *in vitro* у клітинах N2A після впливу Аβ<sub>1–42</sub>. Це підтверджує роль оксидативного дисбалансу в ураженні коркових нейронів.

Одночасно спостерігалось збільшення TUNEL<sup>+</sup> клітин і зниження NeuN<sup>+</sup> — ознаки апоптозу, які були послаблені лікуванням біциклолом.

## **Пригнічення апоптозу та активація Nrf2/HO-1**

Відповідно до даних літератури (Pang та ін., 2022), у мозку ХА-моделей підвищується експресія Вах та Cleaved Caspase-3 при зниженні Bcl-2. Наші результати підтвердили ці зміни у групі Tg-контроль і показали, що біциклол нормалізує рівень цих білків та мРНК, запобігаючи апоптозу.

Nrf2 — головний регулятор антиоксидантної відповіді. У нормі він зв'язується з Keap1 у цитоплазмі; при активації вивільняється, транслокується у ядро та індукує транскрипцію HO-1, SOD, NQO1 та інших захисних генів (Li et al., 2022; Saha et al., 2020).

Індукування шляху Nrf2/HO-1 відоме як ефективний спосіб послаблення патологічних ознак ХА (Huang та ін., 2022; Lu та ін., 2022).

Біциклол, як показали Zhang та ін. (2014) і Zhao та ін. (2020), здатний посилювати експресію Nrf2 та HO-1 в інших тканинах.

У нашому дослідженні лікування Віс-Н підвищувало ядерний Nrf2, HO-1 та NQO1 у мозку APP/PS1-мишей і у клітинах N2A. Після нокауту Nrf2 ефекти біциклолу (зростання HO-1 та NQO1 і зниження Вах, Cleaved Caspase-3) зникали, що однозначно підтверджує залежність дії препарату від активації шляху Nrf2/HO-1.

## **Обмеження дослідження**

Автори зазначають два основних обмеження.

Аналіз був обмежений лише корою головного мозку. Хоча покращення когнітивних функцій свідчить про сприятливий вплив і на гіпокамп — ключову ділянку пам'яті — аналіз антиоксидантних та антиапоптотичних ефектів у гіпокампі не проводився. Це планується додатково дослідити у майбутніх роботах.

Відсутність фармакокінетичних даних. У дослідженні не вимірювали концентрацію біциклолу в мозку після введення та його проходження через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Незважаючи на патологічне порушення ГЕБ у APP/PS1-мишей, прямі дані LC-MS/MS щодо кількісного розподілу препарату необхідні для підтвердження його дії у ЦНС.

## Сумарне тлумачення

У сукупності результати показують, що біциклол покращує когнітивні функції у APP/PS1-мишей за рахунок пригнічення оксидативного стресу та апоптозу, що реалізується через активацію сигнального шляху Nrf2/НО-1.

Це відкриває перспективу розробки біциклолу як нового перорального нейропротекторного агента для комплексної терапії хвороби Альцгеймера.

## Висновки

Проведене дослідження показало, що двомісячне введення біциклолу призводить до значного зменшення когнітивних порушень у моделі хвороби Альцгеймера (APP/PS1-миші).

Лікування біциклолом знижувало рівні коркових форм  $\beta$ -амілоїду  $A\beta_{1-40}$  та  $A\beta_{1-42}$ , зменшувало оксидативний стрес і апоптоз нейронів у корі головного мозку.

Виявлені ефекти пов'язані з вираженою антиоксидантною та антиапоптотичною дією препарату, що реалізується за рахунок активації сигнального шляху Nrf2/НО-1 та підвищення експресії його ключових білків (НО-1, NQO1) при одночасному зниженні проапоптотичних факторів (Bax, Cleaved Caspase-3).

Ці результати дозволяють розглядати біциклол як перспективний терапевтичний засіб для лікування хвороби Альцгеймера та корекції пов'язаних із нею когнітивних порушень, а активацію шляху Nrf2/НО-1 — як основний механізм його нейропротекторної дії.

## Список скорочень (Abbreviations)

Скорочення	Розшифрування
AD (XA)	Хвороба Альцгеймера
APP/PS1	$\beta$ -амілоїдний попередник / пресенілін-1 (трансгенна модель)
A $\beta$	$\beta$ -амілоїд
Bax	білок BCL2-associated X protein (проапоптотичний)
Bcl-2	B-cell lymphoma-2 (антиапоптотичний білок)
Bic	біциклол
CAT	каталаза
DMSO	диметилсульфоксид
ELISA	імуноферментний аналіз
GCLC	каталітична субодиниця глутамат-цистеїн-лігази
GSH-Px	глутатіонпероксидаза
HO-1	гемоксигеназа-1
MDA	малоновий діальдегід
MWM	водний лабіринт Морріса
N2A	лінія нейробластоми Neuro-2a
NeuN	нейрональний ядерний білок
NOR	тест розпізнавання нового об'єкта
NQO1	НАД(Ф)Н-хінон-оксидоредуктаза-1
Nrf2	ядерний фактор, пов'язаний з еритроїдом 2

ROS	реактивні форми кисню
SOD	супероксиддисмутаза
TUNEL	TdT-опосередковане мічення розривів ДНК
WT	дикий тип

## Посилання

An Y, Zhang H, Huang S, Pei G (2020) PL201, a reported rhamnoside against Alzheimer's disease pathology, alleviates neuroinflammation and stimulates Nrf2 signaling. *Front Immunol* 11:162. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00162>

Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T (2022) Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 77:101619. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>

Branca C, Ferreira E, Nguyen TV, Doyle K, Caccamo A, Oddo S (2017) Genetic reduction of Nrf2 exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 26:4823–4835. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx361>

Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, Fombonne J, Gorostiza O, Zhang J, Sultana R, Bredesen DE (2010) In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease Transgenic mice: requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. *Free Radic Biol Med* 48:136–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.035>

Caccamo A, Branca C, Piras IS, Ferreira E, Huentelman MJ, Liang WS, Readhead B, Dudley JT, Spangenberg EE, Green KN, Bel-fiore R, Winslow W, Oddo S (2017) Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 20:1236–1246. <https://doi.org/10.1038/nn.4608>

Cai Z, Zhao B, Ratka A (2011) Oxidative stress and  $\beta$ -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 13:223–250. <https://doi.org/10.1007/s12017-011-8155-9>

Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol* 14:450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>

Chen Y, Lin W, Zhong L, Fang Z, Ye B, Wang Z, Chattipakorn N, Huang W, Liang G, Wu G (2023) Bicyclol attenuates obesity-induced cardiomyopathy via inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *Cardiovasc Drugs Ther* 37:1131–1141. <https://doi.org/10.1007/s10557-022-07356-6>

Cheng M, Yuan C, Ju Y, Liu Y, Shi B, Yang Y, Jin S, He X, Zhang L, Min D (2024) Quercetin attenuates oxidative stress and apoptosis in brain tissue of APP/PS1 double transgenic AD mice by regulating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway to improve cognitive impairment. *Behav Neurol* 2024:5698119. <https://doi.org/10.1155/2024/5698119>

- Cui J, Li Z, Qian LB, Gao Q, Wang J, Xue M, Lou XE, Bruce IC, Xia Q, Wang HP (2013) Reducing the oxidative stress mediates the cardioprotection of bicyclol against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 14:487–495. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200263>
- Cummings J, Apostolova L, Rabinovici GD, Atri A, Aisen P, Greenberg S, Hendrix S, Selkoe D, Weiner M, Petersen RC, Salloway S (2023) Lecanemab: appropriate use recommendations. *J Prev Alzheimers Dis* 10:362–377. <https://doi.org/10.14283/jpad.2023.30>
- Espay AJ, Herrup K, Imbimbo BP, Kepp KP, Daly T (2024) Recalibrating the risk-benefit profiles of Lecanemab and donanemab: scales, immunoreactivity, and changes in Amyloid- $\beta$ 42. *J Alzheimers Dis* 99:877–881. <https://doi.org/10.3233/jad-240171>
- Huang Q, Zhang C, Dong S, Han J, Qu S, Xie T, Zhao H, Shi Y (2022) Asafoetida exerts neuroprotective effect on oxidative stress induced apoptosis through PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2/HO-1 pathway. *Chin Med* 17:83. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00630-7>
- Ill-Raga G, Ramos-Fernández E, Guix FX, Tajés M, Bosch-Morató M, Palomer E, Godoy J, Belmar S, Cerpa W, Simpkins JW, Inestrosa FJ (2010) Amyloid- $\beta$  peptide fibrils induce nitrooxidative stress in neuronal cells. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 22:641–652. <https://doi.org/10.3233/jad-2010-100474>
- Jannat S, Balupuri A, Ali MY, Hong SS, Choi CW, Choi YH, Ku JM, Kim WJ, Leem JY, Kim JE, Shrestha AC, Ham HN, Lee KH, Kim DM, Kang NS, Park GH (2019) Inhibition of  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 and cholinesterases by pterosins via a specific structure-activity relationship with a strong BBB permeability. *Exp Mol Med* 51:1–18. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0205-7>
- Jazvinscak Jembrek M, Hof PR, Simic G (2015) Ceramides in Alzheimer's disease: key mediators of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and A $\beta$  accumulation. *Oxid Med Cell Longev* 2015:346783. <https://doi.org/10.1155/2015/346783>
- Jazvinščak Jembrek M, Hof PR, Šimić G (2015) Ceramides in Alzheimer's disease: key mediators of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and A $\beta$  accumulation. *Oxid Med Cell Longev* 2015:346783. <https://doi.org/10.1155/2015/346783>
- Ju TC, Chen SD, Liu CC, Yang DI (2005) Protective effects of S-nitrosoglutathione against amyloid  $\beta$ -peptide neurotoxicity. *Free Radic Biol Med* 38:938–949. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.019>
- Kang C (2024) Donanemab: first approval. *Drugs* 84:1313–1318. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02087-4>
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
- Lee S, Kim TK, Choi JE, Choi Y, You M, Ryu J, Chun YL, Ham S, Hyeon SJ, Ryu H, Kim HS, Im HI (2022) Dysfunction of striatal MeCP2 is associated with cognitive decline in a mouse model of

Alzheimer's disease. *Theranostics* 12:1404–1418. <https://doi.org/10.7150/thno.68439>

Levenson RW, Sturm VE, Haase CM (2014) Emotional and behavioral symptoms in neurodegenerative disease: a model for studying the neural bases of psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol* 10:581–606. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153653>

Li L, Li WJ, Zheng XR, Liu QL, Du Q, Lai YJ, Liu SQ (2022a) Eriodic-tyol ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice by inhibiting ferroptosis via vitamin D receptor-mediated Nrf2 activation. *Mol Med* 28:11. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00442-3>

Li XL, Cui JJ, Zheng WS, Zhang JL, Li R, Ma XL, Lin M, Guo HH, Li C, Yu XY, Du P, Zhao LM, He S, Lan P, Jiang JD, Che Y, Wang LL (2022b) Bicyclol alleviates atherosclerosis by manipulating gut microbiota. *Small* 18:e2105021. <https://doi.org/10.1002/sml.202105021>

Lu N, Tan G, Tan H, Zhang X, Lv Y, Song X, You D, Gao Z (2022) Maackiain prevents Amyloid-beta-induced cellular injury via priming PKC-Nrf2 pathway. *BioMed Res Int* 2022:4243210. <https://doi.org/10.1155/2022/4243210>

Morrone F, Sita G, Graziosi A, Turrini E, Fimognari C, Tarozzi A, Hrelia P (2018) Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in a mouse model of Alzheimer's disease involves Nrf2/HO-1 pathway. *Aging Dis* 9:605–622. <https://doi.org/10.14336/ad.2017.0903>

Mota SI, Costa RO, Ferreira IL, Santana I, Caldeira GL, Padovano C, Fonseca AC, Baldeiras I, Cunha C, Letra L, Oliveira CR, Pereira CM, Rego AC (2015) Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1852:1428–1441. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.015>

Osama A, Zhang J, Yao J, Yao X, Fang J (2020) Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. *Ageing Res Rev* 64:101206. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101206>

Pang K, Jiang R, Zhang W, Yang Z, Li LL, Shimozawa M, Tambaro S, Mayer J, Zhang B, Li M, Wang J, Liu H, Yang A, Chen X, Liu J, Winblad B, Han H, Jiang T, Wang W, Nilsson P, Guo W, Lu B (2022) An app knock-in rat model for Alzheimer's disease exhibiting A $\beta$  and Tau pathologies, neuronal death and cognitive impairments. *Cell Res* 32:157–175. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00582-x>

Park J, Wetzel I, Marriott I, Dréau D, D'Avanzo C, Kim DY, Tanzi RE, Cho H (2018) A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 21:941–951. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0175-4>

Raefsky SM, Furman R, Milne G, Pollock E, Axelsen P, Mattson MP, Shchepinov MS (2018) Deuterated polyunsaturated fatty acids reduce brain lipid peroxidation and hippocampal amyloid  $\beta$ -peptide levels, without discernable behavioral effects in an APP/PS1 mutant transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 66:165–176. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.024>

Rakshit D, Goyal R, Yadav V, Gore SK, Sen S, Ranjan OP, Mishra A (2024) Nanoformulated fisetin ameliorates Alzheimer's disease via reducing proinflammatory cytokines and activating the

NRF2/ HO-1 pathway. Nanomedicine 19:2537–2553. <https://doi.org/10.1080/17435889.2024.2419814>

Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL (2007) Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:75–85. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31802d6da9>

Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L (2020) An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>

Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chetelat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM (2021) Alzheimer's disease. *Lancet* 397:1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)

Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol CB* 24:R453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

Shao X, Cui W, Xie X, Ma W, Zhan Y, Lin Y (2020) Treatment of Alzheimer's disease with framework nucleic acids. *Cell Prolif* 53:e12787. <https://doi.org/10.1111/cpr.12787>

Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2008) Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 106:45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05347.x>

Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative stress. *Annu Rev Bio-chem* 86:715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarria M, Zazueta C, Konigsberg M (2018) Nrf2: molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing Res Rev* 47:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.06.003>

Sun LN, Shen J, Su F, Wang Q, Zhu YJ, Lou XE, Liang HW, Bruce IC, Xia Q (2009) Bicyclol attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient forebrain ischemia in mouse cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 459:84–87. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.002>

Tang JJ, Huang LF, Deng JL, Wang YM, Guo C, Peng XN, Liu Z, Gao JM (2022) Cognitive enhancement and neuroprotective effects of OABL, a sesquiterpene lactone in 5xFAD Alzheimer's disease mice model. *Redox Biol* 50:102229. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102229>

Uruno A, Matsumaru D, Ryoike R, Saito R, Kadoguchi S, Saigusa D, Saito T, Saido TC, Kawashima R, Yamamoto M (2020) Nrf2 suppresses oxidative stress and inflammation in App knock-in

Alzheimer's disease model mice. *Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1128/MCB.00467-19>

Villain N, Planche V, Lilamand M, Cordonnier C, Soto-Martin M, Mollion H, Bombois S, Delrieu J (2025) Lecanemab for early Alzheimer's disease: appropriate use recommendations from the

French federation of memory clinics. *J Prev Alzheimers Dis* 12:100094.

<https://doi.org/10.1016/j.tjpad.2025.100094>

Wan L, Nie G, Zhang J, Luo Y, Zhang P, Zhang Z, Zhao B (2011)  $\beta$ -Amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and *caenorhabditis elegans* models of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 50:122–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.707>

Wan T, Wang Z, Luo Y, Zhang Y, He W, Mei Y, Xue J, Li M, Pan H, Li W, Wang Q, Huang Y (2019) FA-97, a new synthetic caffeic acid phenethyl ester derivative, protects against oxidative stress-mediated neuronal cell apoptosis and Scopolamine-induced cognitive impairment by activating Nrf2/HO-1 signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2019:8239642. <https://doi.org/10.1155/2019/8239642>

Wang Q, Huang X, Su Y, Yin G, Wang S, Yu B, Li H, Qi J, Chen H, Zeng W, Zhang K, Verkhatsky A, Niu J, Yi C (2022) Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway mitigates blood-brain barrier dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain* 145:4474–4488. <https://doi.org/10.1093/brain/awac236>

Wang H, Pan J, Zhang M, Tan Z (2025) Re-evaluation of the efficacy and safety of anti-A $\beta$  monoclonal antibodies (lecanemab/don-anemab) in the treatment of early Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 16:1599048. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1599048>

West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769–772. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92338-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92338-8)

Zhang J, Fu B, Zhang X, Chen L, Zhang L, Zhao X, Bai X, Zhu C, Cui L, Wang L (2013) Neuroprotective effect of bicyclol in rat ischemic stroke: down-regulates TLR4, TLR9, TRAF6, NF- $\kappa$ B, MMP-9 and up-regulates claudin-5 expression. *Brain Res* 1528:80–88. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.06.032>

Zhang J, Fu B, Zhang X, Zhang L, Bai X, Zhao X, Chen L, Cui L, Zhu C, Wang L, Zhao Y, Zhao T, Wang X (2014) Bicyclol upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res Bull* 100:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.11.001>

Zhang Q, Zhang J, Ye J, Li X, Liu H, Ma X, Wang C, He K, Zhang W, Yuan J, Zhao Y, Xu H, Liu Q (2021) Nuclear speckle specific HnRNP D-like prevents age- and AD-related cognitive decline by modulating RNA splicing. *Mol Neurodegener* 16:66. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00485-w>

Zhao T, Yu Z, Zhou L, Wang X, Hui Y, Mao L, Fan X, Wang B, Zhao X, Sun C (2022) Regulating Nrf2-GPx4 axis by bicyclol can prevent ferroptosis in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Cell death discovery* 8: 380. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01173-43>

Zhao TM, Wang Y, Deng Y, Fan XF, Cao XC, Hou LJ, Mao LH, Lin L, Zhao W, Wang BM, Jiang K, Zhao JW, Sun C (2020) Bicyclol attenuates acute liver injury by activating autophagy, anti-oxidative and anti-inflammatory capabilities in mice. *Front Pharmacol* 11:463. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00463>

Zhao W, Yan Y, Xiao Z, Wang M, Xu M, Wang Z, Wang Y, Zhuang Z, Yang D, Chen G, Liang G (2021) Bicyclol ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in mice via inhibiting MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Biomed pharmacotherapy = Biome-decine Pharmacotherapie* 141:111874. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111874>