

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ТИРОНАМИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Д. А. Филимонов<sup>1✉</sup>, А. Б. Ересько<sup>2</sup>, Е. В. Ракша<sup>2</sup>, Н. Н. Трубникова<sup>1</sup>, Р. В. Ищенко<sup>1</sup>, Д. А. Терещенко<sup>1</sup>, И. А. Кисиленко<sup>1</sup>, И. Н. Носова<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт неотложной и восстановительной хирургии имени В. К. Гусака Министерства здравоохранения Российской Федерации, Донецк, Россия<sup>2</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

Окислительный стресс при ишемическом инсульте — один из основных факторов, повреждающих нервную ткань. Тиреоидные гормоны оказывают существенное влияние на редокс-статус организма, однако влияние их производных, тиронаминов, рассматриваемых в качестве потенциальных нейропротекторов, на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) изучено недостаточно. Целью исследования было изучить влияние синтетического аналога тиронамина TOAM на основные показатели ПОЛ в модели острой ишемии головного мозга. Для моделирования острой ишемии головного мозга у белых крыс выполняли необратимую перевязку правой общей сонной артерии. Животные были разделены на две группы — контрольную без лечения и экспериментальную, в которой интраперитонеально вводили синтетический аналог тиронамина TOAM (75 мг/кг массы тела крысы). Спустя сутки крысу подвергали декапитации, и ткань коры больших полушарий головного мозга извлекали для биохимического анализа. Из показателей ПОЛ определяли малоновый диальдегид (МДА), супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу (ГПО) спектрофотометрически. На фоне введения синтетического аналога тиронамина TOAM наблюдали статистически значимое снижение содержания МДА в ишемизированном полушарии в 2 раза ( $p = 0,022$ ), повышение активности ГПО в ткани головного мозга в 2,49 раза ( $p = 0,004$ ) для интактного и в 2,65 раза ( $p = 0,021$ ) — для ишемизированного полушарий и увеличение активности СОД в ишемизированном полушарии в 1,23 раза ( $p = 0,042$ ). Синтетический аналог тиронамина TOAM обладает значительным потенциалом в отношении активации механизмов антиоксидантной защиты в коре головного мозга белых лабораторных крыс в условиях острой полушарной ишемии.

**Ключевые слова:** тиронамины, антиоксиданты, нейропротекция, ишемический инсульт, окислительный стресс, перекисное окисление липидов**Финансирование:** исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 1023042500162-8-3.1.4;3.2.25 (2023-2025).**Вклад авторов:** Д. А. Филимонов — основная идея, общее руководство, разработка статистической модели, обработка данных; А. Б. Ересько, Е. В. Ракша — сбор информации, анализ литературных данных, подготовка и спектроскопические исследования синтетического аналога TOAM; Н. Н. Трубникова — дизайн эксперимента по моделированию ишемии, экспериментальная часть, сбор информации, подготовка текста статьи; Р. В. Ищенко — общее руководство, сбор информации, правки текста; Д. А. Терещенко — биохимические исследования, сбор информации, правки чернового текста статьи; И. А. Кисиленко — экспериментальная работа с лабораторными животными, подготовка текста, внесение правок; И. Н. Носова — сбор информации, обработка данных.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «ИНВХ имени В. К. Гусака» Минздрава России (протокол № 3 от 23 ноября 2023 г.).✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Алексеевич Филимонов  
пр-т Ленинский, д. 47, г. Донецк, 283045, Россия; neuro.dnmu@yandex.ru**Статья получена:** 04.01.2024 **Статья принята к печати:** 04.02.2024 **Опубликована онлайн:** 22.03.2024**DOI:** 10.47183/mes.2024.003

## ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE SYNTHETIC THYRONAMINE ANALOGUE IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Filimonov DA<sup>1 ✉</sup>, Eresko AB<sup>2</sup>, Raksha EV<sup>2</sup>, Trubnikova NN<sup>1</sup>, Ischenko RV<sup>1</sup>, Tereschenko DA<sup>1</sup>, Kisilenko IA<sup>1</sup>, Nosova IN<sup>1</sup><sup>1</sup> V.K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery, Donetsk, Russia<sup>2</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

The oxidative stress associated with ischemic stroke is a major factor damaging the nervous tissue. Thyroid hormones have a significant effect on the body's redox status, however, the impact of their derivatives, thyronamines, considered as potential neuroprotectors, on the characteristics of lipid peroxidation (LP) is not clearly understood. The study was aimed to assess the impact of the TOAM thyronamine synthetic analogue on the main LP indicators in the model of acute cerebral ischemia. Permanent ligation of the right common carotid artery was performed to simulate acute cerebral ischemia in white rats. The animals were divided into two groups: the control group receiving no treatment and the experimental group, to which the TOAM thyronamine synthetic analogue was intraperitoneally administered (75 mg/kg of the rat's body weight). After 24 h the rat was decapitated, and the cerebral cortex tissue was extracted for biochemical analysis. The following LP indicators were determined by spectrophotometry: malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx). When administering the TOAM thyronamine synthetic analogue, a significant (2-fold) decrease in MDA levels was observed in the ischemic hemisphere ( $p = 0,022$ ), along with the 2.49-fold increase in the GPx activity in the brain tissue ( $p = 0,004$ ) of the intact hemisphere and the 2.65-fold increase in its activity ( $p = 0,021$ ) in the ischemic hemisphere, as well as the 1.23-fold increase in SOD activity in the ischemic hemisphere ( $p = 0,042$ ). The TOAM thyronamine synthetic analogue has a great potential in terms of activation of the antioxidant protection mechanisms in the cerebral cortex of white laboratory rats under conditions of acute hemispheric ischemia.

**Keywords:** thyronamines, antioxidants, neuroprotection, ischemic stroke, oxidative stress, lipid peroxidation**Funding:** the study was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation № 1023042500162-8-3.1.4;3.2.25 (2023–2025).**Author contribution:** Filimonov DA — core concept, general management, constructing the statistical model, data processing; Eresko AB, Raksha EV — data acquisition, literature review, TOAM synthetic analogue preparation and spectroscopic analysis; Trubnikova NN — design of the experiment on ischemia simulation, experimental procedure, data acquisition, manuscript writing; Ischenko RV — general management, data acquisition, manuscript editing; Tereschenko DA — biochemical tests, data acquisition, manuscript draft editing; Kisilenko IA — animal experiments, manuscript writing and editing; Nosova IN — data acquisition and processing.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the V.K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery (protocol No 3 dated 23 November 2023).✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry A. Filimonov  
Leninsky Prospekt, 47, Donetsk, 283045, Russia; neuro.dnmu@yandex.ru**Received:** 04.01.2024 **Accepted:** 04.02.2024 **Published online:** 22.03.2024**DOI:** 10.47183/mes.2024.003

Инсульт — одна из ведущих причин смертности в мире и ведущая причина стойкой инвалидизации, которая ложится тяжелым экономическим бременем на все общество. Развитие ишемии сопровождается стремительной гибелью миллионов нейронов в течение нескольких секунд. К сожалению, в настоящее время все еще отсутствуют эффективные средства нейропротекции, способные нивелировать этот процесс [1].

Одним из основных механизмов такого повреждения служит оксидативный (окислительный) стресс (ОС), сопровождающийся выделением активных форм кислорода (АФК). Головной мозг особенно чувствителен к оксидативному повреждению, поскольку содержит большое количество полиненасыщенных жирных кислот, представляющих собой одну из предпочтительных целей для АФК. Через 24 ч после перманентной окклюзии среднемозговой артерии (СМА) в эксперименте на грызунах в очаге ишемического инсульта (ИИ) отмечают высокие показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), конечные продукты которого активируют фосфолипазу А<sub>2</sub>, расщепляющую фосфолипиды клеточных мембран с выделением провоспалительных медиаторов. В этот же период времени отмечают низкий уровень антиоксидантов с последующим его нарастанием [2, 3]. Основания ДНК также в значительной степени восприимчивы к повреждению оксидантами. Вследствие этого возникают мутации и делеции как в первичной, так и во вторичной структурах не только ядерной, но и митохондриальной ДНК, причем вторая более уязвима, поскольку располагается ближе к первоисточнику АФК и обладает меньшей репарационной способностью по сравнению с ядерной ДНК. Продукты ПОЛ также могут действовать как триггеры сигнального пути р53, вызывая изменения в строении мембран и утрату функций митохондриальной ДНК [4]. При нарушении редокс-гомеостаза повреждается и иммунная система, вследствие чего могут развиваться аутоиммунные и нейродегенеративные заболевания. С точки зрения оценки интенсивности ОС особый интерес представляют такие показатели, как один из биомаркеров ОС — малоновый диальдегид (МДА), эндогенный антиоксидант супероксиддисмутаза (СОД) и глутатионпероксидаза (ГПО), катализирующая окисление восстановленного глутатиона.

Вклад тиреоидных гормонов (ТГ) в поддержание редокс-статуса неоднозначен. Есть литературные данные, указывающие на то, что гипертиреоз приводит к увеличению продукции АФК, а гипотиреоз — к ее уменьшению, снижая при этом антиоксидантную активность [5, 6]. Митохондрии нейронов — одна из мишеней как для ТГ, так и для их производных (в частности, тиронаминов), причем при дефиците ТГ наблюдают морфофункциональные нарушения в работе этих органелл. В культуре астроцитов было продемонстрировано усиление экспрессии генов бета-окисления пальмитата в митохондриях под влиянием трийодтиронина (Т<sub>3</sub>), что приводило к увеличению содержания в клетках аденозинтрифосфата (АТФ), необходимого для нормальной работы ионных насосов [7, 8]. Учитывая ведущую роль астроцитов в защите нейронов при ишемическом повреждении головного мозга, авторы пришли к выводу, что при экспериментальной транзиторной ишемии снижение размеров очага поражения обусловлено именно нормализацией энергообмена в астроглии, которую обеспечивает ТЗ.

Однако это только один из предполагаемых механизмов нейропротекции, осуществляемой ТГ. Описание роли

их производных — тиронаминов — в защите нейронов обычно ограничивалось гипотермическим эффектом, описанным в литературе. Мы предположили, что тиронамины, в частности, ТОАМ, также могут вносить свой вклад в антиоксидантную защиту нервной ткани. Целью исследования было изучить концентрацию продуктов, активно реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), СОД и ГПО в ткани головного мозга лабораторных крыс после экспериментальной острой ишемии на фоне введения синтетического аналога тиронамина ТОАМ (CA-ТОАМ) в качестве предполагаемого нейропротектора.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез CA-ТОАМ — гидрохлорида 4-[4-(2-аминоэтоксифенил)анилина] — был осуществлен авторами по описанной в литературе методике [9]. Структура полученного соединения подтверждена методом ЯМР (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) спектроскопии.

Для эксперимента было отобрано 40 животных из собственного вивария ФГБУ «ИНВХ имени В. К. Гусака» Минздрава России, обоих полов, массой 190–210 г. В качестве модели острой ишемии головного мозга была выбрана перманентная перевязка правой общей сонной артерии (ОСА) у белых нелинейных лабораторных крыс. Согласно опубликованным исследованиям, данная модель вызывает формирование небольших по размерам инфарктов коры головного мозга [10]. Операцию проводили под общей анестезией («Калипсол», 100 мг/кг массы тела крысы). В качестве растворителя для CA-ТОАМ использовали диметилсульфоксид (DMSO). В исследовании по изучению биологических эффектов различных растворителей интраперитонеальное введение DMSO крысам в дозе 5 мл/кг в течение месяца расценено как относительно безопасное [11]. Животные были разделены на две экспериментальные группы по 20 особей в каждой. В первой группе («Контроль») проводили операцию по перевязке правой ОСА, через 10 мин после наложения лигатуры вводили внутривенно 0,5 мл раствора DMSO + 0,5 мл раствора NaCl 0,9%. Во второй группе («Эксперимент») животным вводили после операции 0,5 мл раствора DMSO + 0,5 мл раствора NaCl 0,9% + CA-ТОАМ в дозе 75 мг/кг массы тела крысы. Оптимальная доза 75 мг/кг была выбрана на основании максимального выраженного индукции гипотермии при нулевой летальности, исходя из исследования, описанного нами ранее [12]. С учетом максимальной активности ОС в течение первых минут после индукции ишемии [13], препарат вводили через 10 мин после перевязки ОСА. Через сутки после эксперимента животных подвергали декапитации с извлечением головного мозга. Ткань коры больших полушарий — отдельно интактного и ишемизированного — использовали для определения показателей ПОЛ.

Навеску свежей ткани коры больших полушарий головного мозга крыс гомогенизировали не менее 10 мин в стеклянном гомогенизаторе с буфером 50 мМ трис, содержащим 1 мМ ЭДТА и 0,25М сахарозы, pH 7,4, в соотношении 1:3. Готовый гомогенат замораживали при –70 °С минимум на сутки. После размораживания его центрифугировали в течение 30 мин при 4000 об/мин, после чего разводили центрифугат в 6 раз (50 мкл надосадочной жидкости + 250 мкл 5 мМ калий-фосфатного буфера, содержащего  $1 \times 10^{-4}$  М ЭДТА pH 7,8).

Количество белка определяли по методу Лоури фотометрически при  $\lambda = 750$  нм в кювете 5 мм. Результаты

данного метода необходимы для пересчета содержания СОД, ГПО и ТБК-АП в гомогенате головного мозга животного (на 1 мг белка). Метод определения активности СОД в гомогенате ткани мозга основан на способности фермента тормозить реакцию аутоокисления адrenalина в адренохром при pH 10,2. Кинетику окисления измеряли спектрофотометрически при  $\lambda = 480$  нм в кювете 10 мм на биохимическом анализаторе Erpendorf EPAC 6140 (Erpendorf AG; Германия). Содержание ТБК-АП определяли по реакции МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием окрашенного «триметинового комплекса», содержание которого определяли фотометрически при  $\lambda = 532$  нм в кювете 10 мм. Экстинкцию измеряли на биохимическом анализаторе Erpendorf EPAC 6140. Активность ГПО оценивали по изменению количества восстановленного глутатиона (GSH) до и после инкубации с модельным субстратом (гидропероксид трет-бутила) по реакции с реактивом Элмана (5,5-дитиобис-2-нитробензойная кислота). Измеряли оптическую плотность в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм на биохимическом анализаторе Erpendorf EPAC 6140.

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием пакета программ для статистических вычислений R (R Core Team, 2018). Согласно результатам теста Шапиро–Вилка, показатели ТБК-АП ( $W = 0,79$ ,  $p = 0,01$ ), ГПО ( $W = 0,860$ ,  $p = 0,016$ ) и СОД ( $W = 0,89$ ,  $p = 0,41$ ) в ишемизированном полушарии не подчинялись нормальному закону распределения. Для выявления различий между выборками был использован непараметрический критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты биохимических исследований, характеризующие активность антиоксидантных систем в ткани головного мозга лабораторных животных в модели острой церебральной ишемии, представлены в таблице и на рисунке.

При сравнении уровней ТБК-АП в интактном полушарии было выявлено, что у крыс, получавших СА-ТОАМ, этот показатель был в 3,4 раза выше, чем у животных контрольной группы ( $p < 0,001$ ). Однако в ишемизированном полушарии у крыс, которым вводили исследуемый потенциальный нейротропектор, содержание ТБК-АП оказалось примерно в 2 раза ниже, чем у контрольных животных с ишемией без терапевтической коррекции ( $p = 0,022$ ).

При сравнении активности ГПО у крыс контрольной и экспериментальной групп было выявлено, что введение

СА-ТОАМ приводит к повышению активности данного фермента в 2,49 и 2,65 раза соответственно в ткани коры головного мозга как интактного ( $p = 0,040$ ), так и ишемизированного ( $p = 0,021$ ) полушарий.

Статистически значимых отличий в активности СОД в ткани коры интактных полушарий головного мозга крыс в контроле и в эксперименте выявлено не было ( $p = 0,750$ ). Однако в ишемизированном полушарии животных, получавших СА-ТОАМ, активность СОД оказалась в 1,23 раза выше, чем у крыс контрольной группы ( $p = 0,042$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

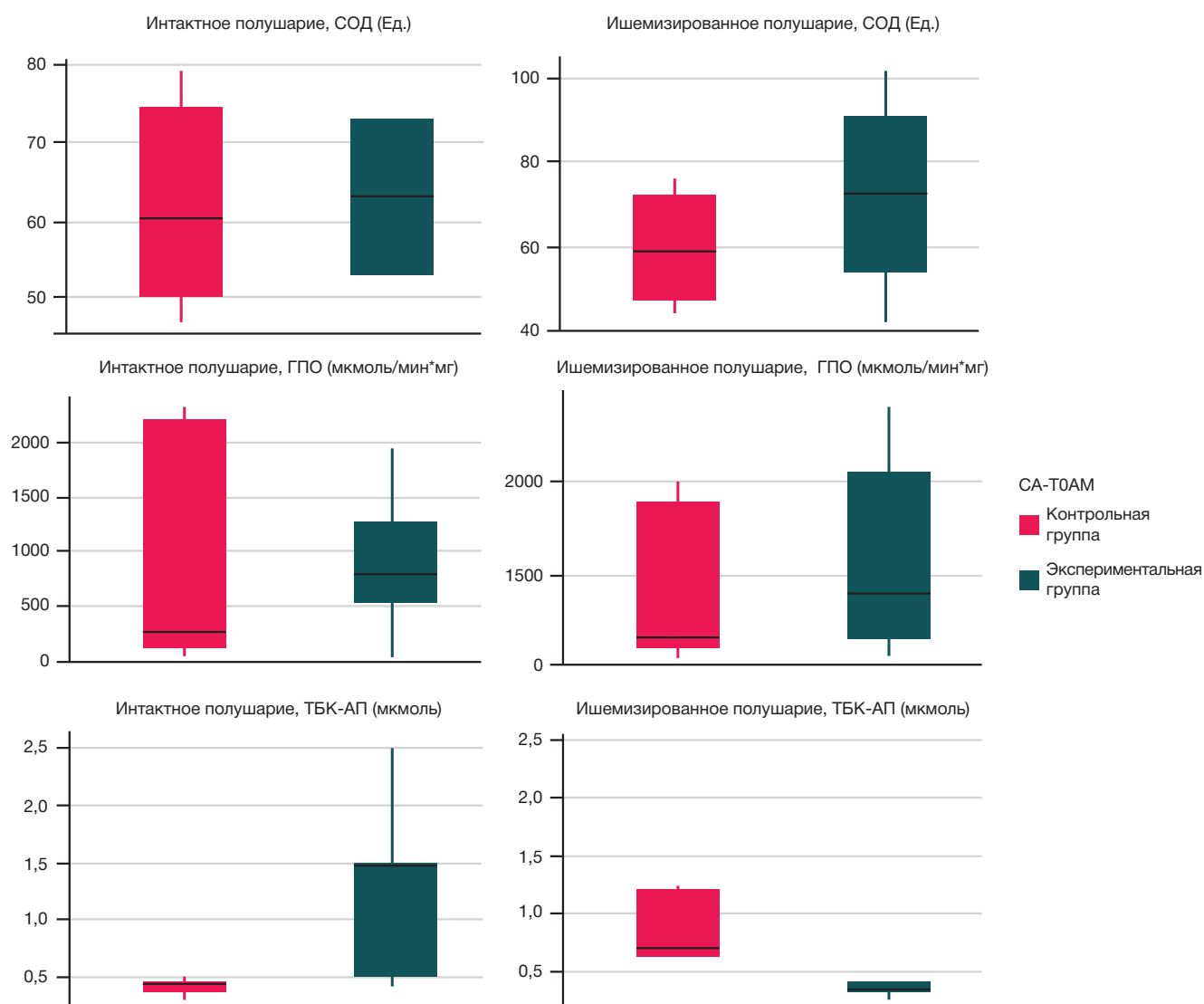
### Изменение содержания МДА при острой ишемии

Увеличение количества ТБК-АП, которое наблюдали в гомогенатах полушарий головного мозга крыс, свидетельствует об активации процессов ОС при ишемии. МДА представляет собой стабильный и токсичный продукт ПОЛ. Повышение уровня МДА, основного компонента ТБК-АП, приводит к нарушению проницаемости и последующему разрушению клеточных мембран, выходу лизосомальных ферментов и активации процессов лизиса клеточных структур.

Исследователями было показано статистически значимое увеличение количества МДА в крови пациентов с ИИ без обнаружения корреляции с исходом заболевания, в то время как в другой работе выявили зависимость между сывороточным уровнем МДА и функциональным исходом заболевания через 3 месяца, в связи с чем даже предложили использовать МДА в качестве биопредиктора [2, 3]. Ряд авторов подтверждает наличие существенной положительной корреляции между уровнями МДА и функциональным исходом инсульта через неделю после поступления пациента в отделение, а в одном из исследований обнаружили, что по уровню МДА в день поступления и через 7 дней можно прогнозировать функциональную нетрудоспособность пациента спустя 6 месяцев по шкале mRS [14, 15]. Замечена и существенная связь между уровнем МДА и тяжестью инсульта по шкале NIHSS. Из-за недостаточного потребления кислорода в зоне пенумбры скапливается огромное количество свободных радикалов (о чем и свидетельствует накопление МДА). Степень повреждения зависит от активности механизмов антиоксидантной защиты. При тяжелом течении инсульта из-за большого объема поврежденных тканей антиоксиданты не справляются со связыванием свободных радикалов. Антиоксидантные ферменты

**Таблица.** Показатели антиоксидантной защиты в ткани головного мозга крыс в модели острой полушарной ишемии (показатели СОД, ГПО и ТБК-АП указаны в пересчете на 1 мг белка)

| Группы   | Контроль |         | Эксперимент |         | p       |
|--|----------|---------|-------------|---------|---------|
|  | n        | Медиана | n           | Медиана |         |
| Показатель                                     |          |         |             |         |         |
| СОД, Ед., интактное полушарие                  | 16       | 60      | 16          | 63      | 0,75    |
| СОД, Ед., ишемизированное полушарие            | 18       | 59      | 18          | 72,5    | 0,042   |
| ГПО, мкмоль/мин.*мг, интактное полушарие       | 16       | 278,5   | 18          | 693     | 0,004   |
| ГПО, мкмоль/мин.*мг, ишемизированное полушарие | 16       | 304     | 18          | 805     | 0,021   |
| ТБК-АП, мкмоль, интактное полушарие            | 20       | 0,44    | 20          | 1,5     | < 0,001 |
| ТБК-АП, мкмоль, ишемизированное полушарие      | 20       | 0,7     | 20          | 0,34    | 0,022   |



**Рис.** Активность маркеров окислительного стресса в головном мозге крыс в модели острой полушарной ишемии. ТБК-АП — концентрация продуктов, активно реагирующих с тиобарбитуровой кислотой; СОД — супероксиддисмутаза; ГПО — глутатионпероксидаза

являются индуцируемыми ферментами, потому для их транскрипции и синтеза требуется определенное время. Таким образом, в начальной фазе развития инсульта происходит усиление ПОЛ из-за недостаточной стимуляции антиоксидантных защитных механизмов, что отражает объем инсульта и, как следствие, тяжесть его течения, а МДА служит чувствительным маркером данного процесса. Снижение уровня ТБК-АП в гомогенатах ткани головного мозга крыс на фоне введения CA-T0AM указывает на уменьшение степени ОС в данной группе животных [16].

#### Изменение активности ГПО при острой ишемии

Считается, что ГПО обладает защитной функцией в отношении повреждений головного мозга. У мышей с нокаутированным геном глутатионпероксидазы 1 (ГПО1) в эксперименте по окклюзии СМА с последующей реперфузией наблюдают увеличение размеров инфаркта и усиление апоптоза [17, 18]. У этих животных наблюдали увеличение активности каспазы-3, которая повышается при ОС, что также свидетельствует в пользу того, что чувствительные к ГПО1 АФК играют важную роль в регуляции апоптоза. Данные подтверждают, что ГПО1 способна эффективно взаимодействовать не только с

главными сигнальными путями нейрональной смерти, но также и с механизмами постишемического воспаления. Это позволяет ряду авторов рассматривать ГПО1 как многообещающий инструмент для терапевтического вмешательства в процессы, связанные с предотвращением или регулированием постишемического повреждения головного мозга [19].

Было показано защитное действие сверхэкспрессии ГПО в отношении нейронов головного мозга при фокальной ишемии у крыс. В эксперименте на 62 особях моделировали окклюзию СМА и стереотаксически вводили в полосатые ядра (очаг ишемии) вирусные векторы, экспрессирующие либо GPx1/lacZ (опытная группа), либо только lacZ (контроль). Было выявлено, что при введении векторов за 12 ч до операции выживаемость нейронов была на 36% выше в сравнении с показателями контрольной группы. При введении вектора через 2 и 5 ч после операции выживаемость нейронов была выше соответственно на 26% и 25% в сравнении с контролем. Морфологически было подтверждено, что в обеих группах тяжесть ишемии была одинаковой. С использованием иммунофлуоресцентного окрашивания авторы показали, что сверхэкспрессия ГПО предотвращает высвобождение цитохрома с из митохондрий нейронов и ограничивает опосредованное

азотом повреждение этих органоидов, подавляет экспрессию Вах и каспазы-3 и активирует экспрессию Bcl-2, что указывает на участие ГПО в ингибировании эндогенного пути апоптоза. Эндогенная ГПО синтезируется в нейронах, и перенос гена с вектором усиливает ее продукцию. Астроциты защищают нейроны от ОС за счет содержащегося в них глутатиона, и сверхэкспрессия ГПО также способствует его превращению в окисленную форму после реакции с АФК. ГПО обладает способностью напрямую блокировать определенные этапы пути апоптоза без снижения общего уровня АФК. Например, повышение продукции Bcl-2 на фоне сверхэкспрессии ГПО способно блокировать высвобождение цитохрома с. Цитозольный цитохром формирует существенную часть апоптосомы у позвоночных, которая включает в себя также прокаспазу-9. Активация каспазы-9 индуцирует активацию каспазы-3, которая запускает биохимическое разрушение клеток. Данные указывают на то, что ГПО предотвращает апоптоз на уровне высвобождения цитохрома с, в пользу чего свидетельствуют повышение экспрессии Bcl-2 и снижение экспрессии Вах. Введение вектора с геном ГПО спустя 4–6 ч от развития ишемии может предотвращать вторую фазу активации каспазы и уменьшать за счет этого гибель нейронов в очаге ишемии. Исследователи устанавливают терапевтическое окно для этого способа доставки гена ГПО в очаг заболевания в 9–11 ч [20].

Таким образом, повышение активности ГПО — эндогенный защитный механизм, обеспечивающий выживаемость нейронов при инсульте, и введение СА-ТОАМ в значительной степени усиливает активность данного фермента.

### Изменение активности СОД при острой ишемии

СОД относится к основным ферментам антиоксидантной защиты. Незначительная активация СОД в гомогенатах экспериментального полушария после окклюзии характерна для ишемизированных тканей и свидетельствует об адаптивной перестройке процессов антиоксидантной защиты в ответ на нарушение поступления кислорода в клетки. В целом, литературные данные по активности СОД на фоне ИИ противоречивы. Так, было показано значительное снижение уровня СОД в крови у лиц с ИИ крупных (но не мелких!) сосудов [21], такие же результаты получены при изучении СОД в сыворотке 41 пациента с острым ИИ [22]. Однако другие исследователи, напротив, указывают на резкое повышение уровня СОД в плазме больных, поступивших в отделение, и объясняют это значительным повышением содержания свободных радикалов в организме [23]. Таким образом, на сегодняшний день данные об изменении активности СОД при ишемии головного мозга противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

На молекулярном уровне у животных с нокаутированным геном СОД2 наблюдали повышение уровня цитозольного цитохрома с и фрагментацию ДНК. У крыс со сверхэкспрессией СОД1, напротив, содержание цитохрома с в цитозоле низкое. Высвобождение цитохрома с приводит к усилению продукции АФК за счет ингибирования дыхательной цепи. Считается, что АФК также инициируют выход цитохрома с из митохондрий. Таким образом, формируется «порочный круг» высвобождения цитохрома с из митохондрий нейронов при ишемии, что в итоге приводит к активации апоптотического каскада [20].

Наши данные указывают на активацию СОД в ответ на введение СА-ТОАМ, что подтверждает влияние этого потенциального нейропротектора на усиление антиоксидантной защиты в ткани головного мозга при ишемии.

### Влияние тиронаминов на показатели антиоксидантной защиты

Тиронамины T1AM и TOAM способны дозозависимо связываться с рецептором TAAR1 (Trace Amine-Associated Receptor 1), что сопровождается выработкой циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), однако на сегодняшний день сложно достоверно утверждать, что TAAR1 — единственный эндогенный рецептор, благодаря которому данные биогенные амины реализуют свои эффекты. Так, усиление выработки цАМФ на клеточном уровне не согласуется с развитием гипотермии и снижением сердечной функции. Следовательно, либо активация TAAR1 не сопряжена с G-белками в отдельных тканях, либо тиронамины способны взаимодействовать и с другими формами TAAR [24]. Возможно, эффекты тиронаминов опосредованы взаимодействием также и с рецепторами, отличными от TAAR. Ряд авторов отмечает накопление T1AM внутри клеток, что позволяет предположить существование внутриклеточных мишеней для данного производного ТГ [25]. Интересно, что в некоторых случаях TOAM влияет на потребление  $O_2$  в большей степени, чем T1AM, хотя данный тиронамин менее эффективен в индукции гипотермии *in vivo* [9].

Тиронамины — природные декарбокислированные производные ТГ. Их введение *in vivo* зачастую вызывает эффекты, противоположные эффектам, вызываемым гормонами щитовидной железы, включая снижение температуры тела. Поскольку известно, что митохондриальный аппарат передачи энергии служит потенциальной мишенью ТГ и их производных, в 2012 г. было исследовано влияние TOAM и T1AM *in vitro* на скорость потребления  $O_2$  и выделение  $H_2O_2$  митохондриями печени крысы. В работе использовали животных с гипотиреозом из-за низкого содержания в их организме эндогенных тиронаминов. Авторы обнаружили, что инкубация митохондриальных препаратов с тиронаминами вызывает снижение активности белкового комплекса III дыхательной цепи, а эндогенный T1AM способен существенно снижать потребление  $O_2$ , вероятно, замедляя скорость перемещения электронов по дыхательной цепи, и усиливать выработку АФК митохондриями печени у крыс с гипотиреозом. Кроме того, T1AM окисляется моноаминоксидазами внешней мембраны митохондрий за счет  $O_2$ , который затем восстанавливается до  $H_2O_2$  [26, 27].

Влияние тиронамина на активность фермента ГПО в мозге мало изучено и требует дальнейшего исследования. Активация процессов свободнорадикального окисления, увеличение количества АФК, о чем косвенно свидетельствует повышение уровня ТБК-АП и активности СОД в нашем эксперименте, включает процессы редокс-сигнализации. Считается, что система Nrf2-Keap1-ARE является основной ответственной за включение адаптивных механизмов в клетках в условиях ОС. Ядерный фактор Nrf2 представляет собой фактор транскрипции, регулирующий ряд генов антиоксидантной защиты, которые действуют синергически, обеспечивая связывание АФК посредством каскада ферментативных реакций. Гены-мишени Nrf2

участвуют в нейтрализации свободных радикалов, детоксикации ксенобиотиков и поддержании редокс-потенциала. Обычно Nrf2 локализован в цитоплазме и связан с белком Keap1. ОС модифицирует положение связывающих групп в комплексе Nrf2-Keap1, вызывая диссоциацию и перемещение Nrf2 в ядро клетки, где он связывается с антиоксидантным элементом (antioxidant response element, ARE), расположенным в промоторном участке целого ряда генов, кодирующих ферменты синтеза и обмена глутатиона (глутаматцистеинлигаза, глутатион-S-трансфераза, ГПО, глутатионредуктаза) и других ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталаза) [28]. Таким способом запускается активация транскрипции этих генов, и данный механизм может пояснить, почему в интактном полушарии, в меньшей степени затронутым ОС, значения ТБК-АП выше, чем в ишемизированном. На животной модели было показано, что активация Nrf2 способна спасти ткань в зоне пенумбры, но не в ядре инсульта, а профилактическое лечение улучшает функциональный исход в течение месяца. При делециях гена Nrf2 животные становятся чувствительными к действию стрессорных факторов, а также более уязвимыми для ишемического повреждения головного мозга и прочих неврологических нарушений [29]. Увеличение активности ГПО в ответ на возрастание уровня ТБК-АП в гомогенатах ишемизированного полушария до введения СА-Т0АМ, и особенно после введения, может быть также вызвано активацией системы редокс-сигнальной Nrf2-Keap1-ARE [30].

Иными словами, влияние ТГ и их производных (в частности, тиронаминов) на редокс-статус организма и отдельных его тканей подтверждено рядом авторов, однако характер этого воздействия крайне противоречив и требует дальнейшего изучения.

## ВЫВОДЫ

Согласно результатам нашего исследования, содержание ТБК-АП в ишемизированном полушарии белых крыс снижается в ответ на введение синтетического аналога тиронамина Т0АМ (75 мг/кг массы тела крысы интраперитонеально). В то же время наблюдают усиление активности СОД в ишемизированном полушарии и значительное повышение активности ГПО в ткани обоих полушарий головного мозга крыс экспериментальной группы. Это дает основания предполагать, что используемый нами в качестве нейропротектора СА-Т0АМ обладает значительным потенциалом в отношении активации механизмов антиоксидантной защиты в коре головного мозга белых лабораторных крыс в условиях острой полушарной ишемии.

В дальнейшем планируется продолжение поиска наиболее перспективных синтетических аналогов тиронаминов (более удобных для применения в клинике водорастворимых форм с более выраженным гипотермическим эффектом), определение их биологических свойств в модели фокальной церебральной ишемии, а также идентификация сигнальных путей, за счет которых реализуются их нейропротективные эффекты.

## Литература

- Buchan AM, Pelz DM. Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: A Brief Review. *Can J Neurol Sci.* 2022; 49 (6): 741–5. PMID: 34526172. DOI: 10.1017/cjn.2021.223.
- Menon B, Ramalingam K, Kumar R. Evaluating the Role of Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. *J Neurosci Rural Pract.* 2020; 11 (1): 156–9. DOI: 10.1055/s-0039-3402675.
- Elsayed WM, Abdel-Gawad El-HA, Mesallam DIA, Tamer S. The relationship between oxidative stress and acute ischemic stroke severity and functional outcome. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery.* 2020; 56: 1–6. DOI: 10.1186/s41983-020-00206-y.
- Carlsson MJ, Vollmer AS, Demuth P, Heylmann D, Reich D, Quarz C, et al. p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol. *Cell Death Dis.* 2022; 13 (11): 1009. DOI: 10.1038/s41419-022-05446-9.
- Khan M, Mukherjee S, Bank S, Maiti S. Role of Thyroid Hormone and Oxidant Stress in Cardiovascular Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2021; 21 (7): 1282–8. DOI: 10.2174/1871530320666200917114501.
- Glombik K, Detka J, Kurek A, Budziszewska B. Impaired brain energy metabolism: involvement in depression and hypothyroidism. *Front Neurosci.* 2020; 14: 586939. DOI: 10.3389/fnins.2020.586939.
- Incerpi S, Gionfra F, Luca De R, Candelotti E, Vito De P, Percario ZA, et al. Extranuclear effects of thyroid hormones and analogs during development: An old mechanism with emerging roles. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 13: 961744. DOI: 10.3389/fendo.2022.961744.
- Rastoldo G, Tighilet B. Thyroid Axis and Vestibular Physiopathology: From Animal Model to Pathology. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (12): 9826. DOI: 10.3390/ijms24129826.
- Chiellini G, Nesi G, Digiacomo M, Malvasi R, Espinoza S, Sabatini M, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (mTAAR1) Agonists. *J Med Chem.* 2015; 58 (12): 5096–107. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00526.
- Olopade FE, Femi-Akinlosotu OM, Odiri E, Shokunbi MT. Differential effects of common carotid artery occlusion models of ischaemic stroke on sensorimotor function and infarct sizes in rats. *Arch Bas App Med.* 2021; 9: 135–144.
- Gad SC, Cassidy CD, Aubert N, Spainhour B, Robbe H. Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species. *Int J Toxicol.* 2006; 25 (6): 499–521. DOI: 10.1080/10915810600961531. PMID: 17132609.
- Филимонов Д. А., Ересью А. Б., Белоцерковская М. А., Трубинова Н. Н., Федорова А. А., Сауткина Т. Ю. Терморегуляторные эффекты метаболитов тиреоидных гормонов (тиронамина Т0АМ) в in-vivo эксперименте. *Вестник неотложной и восстановительной хирургии.* 2019; 4 (4): 214–22.
- Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, et al. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. *Redox Biol.* 2021; 48: 102178. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102178. PMID: 34773835. PMID: PMC8600061.
- Yaseen Z, Chowdhury D, Shantaram M, Agarwal S. Prognostic significance of plasma homocysteine and malondialdehyde in patients with acute ischemic stroke. *Intern J Pharma Research and Health Sciences.* 2015; 3 (3): 727–36. DOI: 10.1186/s12883-021-02257-x.
- Zhang JJ, Sanchez VDI, Chan JN, Hui ESK, Lau KK, Wang X, et al. Biomarkers for prognostic functional recovery poststroke: A narrative review. *Front Cell Dev Biol.* 2023; 10: 1062807. DOI: 10.3389/fcell.2022.1062807.
- Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, Haan de J, Hertzog P, Iannello RC, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knocked mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem.* 2001; 78 (6): 1389–99. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00535.x. PMID:

- 11579147.
17. Vaskova J, Kocan L, Vasko L, Perjesi P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*. 2023; 28 (3): 1447. DOI: 10.3390/molecules28031447.
  18. Kamal FZ, Lefter R, Jaber H, Balmus IM, Ciobica A, Iordache AC. The Role of Potential Oxidative Biomarkers in the Prognosis of Acute Ischemic Stroke and the Exploration of Antioxidants as Possible Preventive and Treatment Options. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6389. DOI: 10.3390/ijms24076389.
  19. Hoehn B, Yenari MA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke. *Stroke*. 2003; 34: 2489–94. DOI: 10.1161/01.STR.0000091268.25816.19.
  20. Srikrishna R, Suresh DR. Biochemical Study of Antioxidant Profile in Acute Ischemic Stroke. *British Journal of Medical Practitioners*. 2009; 2 (1): 35–7.
  21. Spranger M, Krempien S, Schwab S, Donneberg S, Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. Correlation with clinical course and infarct size. *Stroke*. 1997; 28 (12): 2425–8. DOI: 10.1161/01.str.28.12.2425.
  22. Akinlua I, Asaolu MF, Ojo OC, Oyebanji GO. Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Level of Stroke Patients in Osun State, South-Western Nigeria. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2019; 7 (5): 189–94. DOI: 10.4236/jbm.2019.75020.
  23. Rutigliano G, Zucchi R. Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders. *Cell Mol Neurobiol*. 2020; 40 (2): 239–55. DOI: 10.1007/s10571-019-00743-y.
  24. Leo di N, Moscato S, Borso M, Sestito S, Polini B, Bandini L, et al. Delivery of Thyronamines (TAMs) to the Brain: A Preliminary Study. *Molecules*. 2021; 26 (6): 1616. DOI: 10.3390/molecules26061616.
  25. Rutigliano G, Bandini L, Sestito S, Chiellini G. 3-Iodothyronamine and Derivatives: New Allies Against Metabolic Syndrome? *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (6): 2005. DOI: 10.3390/ijms21062005.
  26. Venditti P, Napolitano G, Stefano L Di, Chiellini G, Zucchi R, Scanlan TS, et al. Effects of the thyroid hormone derivatives 3-iodothyronamine and thyronamine on rat liver oxidative capacity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011; 341 (1–2): 55–62. DOI: 10.1016/j.mce.2011.05.013.
  27. Martin JV, Sarkar PK. Nongenomic roles of thyroid hormones and their derivatives in adult brain: are these compounds putative neurotransmitters? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 14: 1210540. DOI: 10.3389/fendo.2023.1210540.
  28. Yan X, Fu X, Jia Y, Ma X, Tao J, Yang T, et al. Nrf2/Keap1/ARE Signaling Mediated an Antioxidative Protection of Human Placental Mesenchymal Stem Cells of Fetal Origin in Alveolar Epithelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 2654910. DOI: 10.1155/2019/2654910.
  29. Farina M, Vieira LE, Buttari B, Profumo E, Saso L. The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review. *Molecules*. 2021; 26 (16): 5001. DOI: 10.3390/molecules26165001. PMID: 34443584. PMCID: PMC8399750.
  30. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci*. 2022; 291: 120111. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120111.

## References

1. Buchan AM, Pelz DM. Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke: A Brief Review. *Can J Neurol Sci*. 2022; 49 (6): 741–5. PMID: 34526172. DOI: 10.1017/cjn.2021.223.
2. Menon B, Ramalingam K, Kumar R. Evaluating the Role of Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. *J Neurosci Rural Pract*. 2020; 11 (1): 156–9. DOI: 10.1055/s-0039-3402675.
3. Elsayed WM, Abdel-Gawad El-HA, Mesallam DIA, Tamer S. The relationship between oxidative stress and acute ischemic stroke severity and functional outcome. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2020; 56: 1–6. DOI: 10.1186/s41983-020-00206-y.
4. Carlsson MJ, Vollmer AS, Demuth P, Heylmann D, Reich D, Quarz C, et al. p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol. *Cell Death Dis*. 2022; 13 (11): 1009. DOI: 10.1038/s41419-022-05446-9.
5. Khan M, Mukherjee S, Bank S, Maiti S. Role of Thyroid Hormone and Oxidant Stress in Cardiovascular Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2021; 21 (7): 1282–8. DOI: 10.2174/1871530320666200917114501.
6. Glombik K, Detka J, Kurek A, Budziszewska B. Impaired brain energy metabolism: involvement in depression and hypothyroidism. *Front Neurosci*. 2020; 14: 586939. DOI: 10.3389/fnins.2020.586939.
7. Incerpi S, Gionfra F, Luca De R, Candelotti E, Vito De P, Percario ZA, et al. Extranuclear effects of thyroid hormones and analogs during development: An old mechanism with emerging roles. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 961744. DOI: 10.3389/fendo.2022.961744.
8. Rastoldo G, Tighilet B. Thyroid Axis and Vestibular Physiopathology: From Animal Model to Pathology. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (12): 9826. DOI: 10.3390/ijms24129826.
9. Chiellini G, Nesi G, Digiacommo M, Malvasi R, Espinoza S, Sabatini M, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (mTAAR1) Agonists. *J Med Chem*. 2015; 58 (12): 5096–107. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00526.
10. Olopade FE, Femi-Akinlosotu OM, Odiri E, Shokunbi MT. Differential effects of common carotid artery occlusion models of ischaemic stroke on sensorimotor function and infarct sizes in rats. *Arch Bas App Med*. 2021; 9: 135–144.
11. Gad SC, Cassidy CD, Aubert N, Spainhour B, Robbe H. Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species. *Int J Toxicol*. 2006; 25 (6): 499–521. DOI: 10.1080/10915810600961531. PMID: 17132609.
12. Filimonov DA, Yeresko AB, Belotserkovskaya MA, Trubnikova NN, Fedorova AA, Sautkina TYu. Thermoregulatory effects of thyroid hormones metabolites (tyronamine T0AM) in in-vivo experiment. *Bulletin of urgent and recovery surgery*. 2019; 4 (4): 214–22. Russian.
13. Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, et al. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. *Redox Biol*. 2021; 48: 102178. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102178. PMID: 34773835. PMCID: PMC8600061.
14. Yaseen Z, Chowdhury D, Shantaram M, Agarwal S. Prognostic significance of plasma homocysteine and malondialdehyde in patients with acute ischemic stroke. *Intern J Pharma Research and Health Sciences*. 2015; 3 (3): 727–36. DOI: 10.1186/s12883-021-02257-x.
15. Zhang JJ, Sanchez VDI, Chan JN, Hui ESK, Lau KK, Wang X, et al. Biomarkers for prognostic functional recovery poststroke: A narrative review. *Front Cell Dev Biol*. 2023; 10: 1062807. DOI: 10.3389/fcell.2022.1062807.
16. Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, Haan de J, Hertzog P, Iannello RC, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem*. 2001; 78 (6): 1389–99. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00535.x. PMID: 11579147.
17. Vaskova J, Kocan L, Vasko L, Perjesi P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*. 2023; 28 (3): 1447. DOI: 10.3390/molecules28031447.
18. Kamal FZ, Lefter R, Jaber H, Balmus IM, Ciobica A, Iordache AC. The Role of Potential Oxidative Biomarkers in the Prognosis of Acute Ischemic Stroke and the Exploration of Antioxidants as Possible Preventive and Treatment Options. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6389. DOI: 10.3390/ijms24076389.
19. Hoehn B, Yenari MA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Glutathione peroxidase overexpression inhibits cytochrome C release and proapoptotic mediators to protect neurons from experimental stroke. *Stroke*. 2003; 34: 2489–94. DOI: 10.1161/01.STR.0000091268.25816.19.
20. Srikrishna R, Suresh DR. Biochemical Study of Antioxidant Profile

- in Acute Ischemic Stroke. *British Journal of Medical Practitioners*. 2009; 2 (1): 35–7.
21. Spranger M, Krempien S, Schwab S, Donneberg S, Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. Correlation with clinical course and infarct size. *Stroke*. 1997; 28 (12): 2425–8. DOI: 10.1161/01.str.28.12.2425.
  22. Akinlua I, Asaolu MF, Ojo OC, Oyebanji GO. Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Level of Stroke Patients in Osun State, South-Western Nigeria. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2019; 7 (5): 189–94. DOI: 10.4236/jbm.2019.75020.
  23. Rutigliano G, Zucchi R. Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders. *Cell Mol Neurobiol*. 2020; 40 (2): 239–55. DOI: 10.1007/s10571-019-00743-y.
  24. Leo di N, Moscato S, Borso M, Sestito S, Polini B, Bandini L, et al. Delivery of Thyronamines (TAMs) to the Brain: A Preliminary Study. *Molecules*. 2021; 26 (6): 1616. DOI: 10.3390/molecules26061616.
  25. Rutigliano G, Bandini L, Sestito S, Chiellini G. 3-Iodothyronamine and Derivatives: New Allies Against Metabolic Syndrome? *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (6): 2005. DOI: 10.3390/ijms21062005.
  26. Venditti P, Napolitano G, Stefano L Di, Chiellini G, Zucchi R, Scanlan TS, et al. Effects of the thyroid hormone derivatives 3-iodothyronamine and thyronamine on rat liver oxidative capacity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011; 341 (1–2): 55–62. DOI: 10.1016/j.mce.2011.05.013.
  27. Martin JV, Sarkar PK. Nongenomic roles of thyroid hormones and their derivatives in adult brain: are these compounds putative neurotransmitters? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 14: 1210540. DOI: 10.3389/fendo.2023.1210540.
  28. Yan X, Fu X, Jia Y, Ma X, Tao J, Yang T, et al. Nrf2/Keap1/ARE Signaling Mediated an Antioxidative Protection of Human Placental Mesenchymal Stem Cells of Fetal Origin in Alveolar Epithelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 2654910. DOI: 10.1155/2019/2654910.
  29. Farina M, Vieira LE, Buttari B, Profumo E, Saso L. The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review. *Molecules*. 2021; 26 (16): 5001. DOI: 10.3390/molecules26165001. PMID: 34443584. PMCID: PMC8399750.
  30. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci*. 2022; 291: 120111. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120111.